



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KALBE ÖZGÜ DUYU NÖRONLARININ TRANSGENİK  
YAKLAŞIM KULLANILARAK SAĞLIKLI VE İSKEMİK  
HASAR SONRASI FARE KALBİNDE İNCELENMESİ**

SEVİLAY ŞAHOĞLU GÖKTAŞ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL – 2022

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Sevilay ŞAHOĞLU GÖKTAŞ  
Tez Başlığı : Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Transgenik Yaklaşım  
Kullanılarak Sağlıklı ve İskemik Hasar Sonrası Fare Kalbinde  
İncelenmesi  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 28.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. Esra ÇAĞAVI	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof.Dr. Celal AKDENİZ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof. Dr. Bülent AHISHALI	Koç Üniversitesi	
Doç.Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../ ..... tarih ve ...../..... - ..... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Sevilay ŞAHOĞLU GÖKTAŞ

## TEŞEKKÜR

Akademik hayatım boyunca desteğini eksik etmeyen, doktora sürecimde laboratuvarında farklı tekniklerde kendimi geliştirmeme fırsat tanıyan, bilimsel merakımı körükleyen, tez çalışmamı yönlendiren ve destekleyen sayın danışmanım Doç. Dr. Esra Çağavi' ye,

Bilimsel merakımı teşvik eden, tez çalışmalarımda fikir, teorik ve deneysel adımlarda bana yol gösterici olan sayın eş danışmanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Bu tez çalışmasında ve birlikte çalışırken çok şey öğrendiğim, birlikte projeler geliştirip tamamladığım, eş yazarı olduğumuz ortak makalelerimizle doktora serüvenini tamamladığım meslektaşım, lab partnerim Yusuf Enes Kazcı'ya,

*İn vivo* operasyonları yapmamı kolaylaştıran Dr. Behnaz Karadoğan'a, teorik bilgi ve deneyimlerini eksik etmeyen Dr. Mehmet Uğurcan Turhan'a,

Görüntüleme tekniklerine ait engin bilgilerini benimle paylaşan Dr. Mehmet Şerif Aydın'a, virüs üretimi ile ilgili deneysel bilgi ve deneyimlerini paylaşan Dr. Nilüfer Atasoy'a,

Açık iletişimli, yardımlarını eksik etmeyen ve takım ruhunu her daim hissettiren eski ve yeni ekip arkadaşlarım BSc. Aylın Nebol, BSc. Gizem Yörükoğlu, MSc. Tuğçe Torun, MSc. Gökçe İlayda Görgülü Söztekin, Dr. Arzuhan Koç, MSc. Zeynep Durdu, Dr. Özlem Mutlu Burnaz, Dr. Tüba Akgül Çağlar ve MSc. Gizem Örs'e,

Destekleri ve yardımları için bütün REMER idari ve akademik personeline, transgenik fare temini, üretimi ve bakımını sağlayan MEDİTAM idari personel ve bütün çalışma ekibine,

Tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a, bugünlere gelmemde katkısı bulunan tüm kıymetli lisans & yüksek lisans ve doktora hocalarıma ve değerli tez jüri üyelerime,

Uzun süreli eğitim hayatım boyunca mezuniyetimi iple çeken, bu yolda desteklerini, sevgisini ve ilgisini bir an olsun eksik etmeyen canım annem Aysican Şahoğlu, canım babam Münir Şahoğlu'na, kardeşlerime, özellikle tez yazım aşamasında bebeğim Deniz Göktaş'a yorulmadan bakım sağlayan Zehra-Bülent Göktaş'a ve Lokman Şahoğlu'na,

Bu tez çalışmasının son senesinde ailemize katılan, dünyaya gelmeden son güne kadar laboratuvarında çalışmama müsaade eden, doğduktan sonra da bu serüvene kaldığı yerden benimle devam eden, zorlu zamanlarda nefes aldığım biricik, canım oğlum Deniz Göktaş'a

Sonsuz teşekkürler.

# İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAY FORMU</b> .....	<b>i</b>
<b>ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>6</b>
4.1. Sinir Sistemi .....	6
4.2. Sinir hücresinde elektriksel ileti ve aksonal taşınma .....	6
4.2.1 Aksiyon potansiyeli.....	6
4.2.2. Aksonal taşıma .....	8
4.3 Merkezi sinir sistemi .....	9
4.4 Periferik sinir sistemi .....	10
4.4.1. Duyusal Sinir Sistemi.....	11
4.4.2. Duyusal verilerin periferik sinir sistemi ile aktarım mekanizması .....	12
4.5. Organ özelinde spinal afferent çalışmaları.....	14
4.7. Kardiyovasküler Sistem .....	15
4.7.1 Kalp Kasının Kasılma Mekanizması.....	16
4.7.2 Kardiyak aksiyon potansiyeli.....	17
4.8. Kalp ve sinir sistemi ilişkisi .....	19

4.8.1. Kardiyak otonom sinir sistemi .....	20
4.8.2. Kalbi inerve eden afferent lifler .....	23
4.8.3. İntresik Kalp Gangliyonları - Epikardiyal Gangliyonlar .....	29
4.8.4. Küçük yoğun floresan (SIF) hücreler.....	31
4.8.5. Kalp kasında bulunan ve kalbin işleyişine katkıda bulunan diğer hücreler .....	32
4.9 İşlevsel Kalp Çalışmalarında Optogenetik Uygulamalar.....	35
4.9.1. Optogenetik uyarı sisteminin genetik alt yapısı ve çalışma mekanizması.....	35
4.9.2. Kalbe inerve afferentlerde optogenetik uygulamalar.....	37
4.10. Miyokardiyal İnfarktüs.....	39
4.11. Doku şeffaflaştırma yöntemleri.....	40
4.12.Cre-loxP rekombinasyon sistemi .....	42
<b>5. MATERYAL METOT.....</b>	<b>45</b>
5.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar.....	45
5.2 Cihazlar .....	49
5.3. Fare soyları ve Etik Kurul .....	50
5.4. Transgenik Hatların Çoğaltılması, Çaprazlanması ve Genotiplenmesi .....	52
5.5 AKG izolasyonu ve in-vitro ortamda kültür edilmesi.....	54
5.6. Görüntüleme için doku hazırlama ve immünokimyasal işlemler .....	56
5.6.1. Perfüzyon .....	56
5.6.2. İmmünokimyasal boyama .....	56
5.7. Şeffaflaştırma .....	58
5.7.1. iDISCO yöntemi ile şeffaflaştırma.....	58
5.7.2. PACT yöntemi ile şeffaflaştırma .....	59
5.7.3. scaleCUBIC yöntemi ile şeffaflaştırma .....	60
5.8. Mikroskop ve Görüntü işleme.....	61
5.9. <i>In vivo</i> girişimler .....	62
5.9.1 Trakeostami.....	62

5.9.2. Torakotomi .....	63
5.9.3. Kalbe enjeksiyon .....	63
5.9.4. İntratekal Enjeksiyon .....	64
5.9.5. İntraperitoneal Enjeksiyon .....	65
5.9.6. AKG virüs veya boya enjeksiyonu .....	65
5.9.7. Vagatomi .....	66
5.11. Farelerde kronik MI modelinin oluşturulması .....	68
5.12. Rekombinant adeno-asosiyé virüs üretimi .....	69
5.12.1. Plazmid DNA çoğaltma .....	70
5.12.2. DNA izolasyonu .....	71
5.12.3. HEK293AAV hücre transfeksiyonu .....	71
5.12.4 Virüs Saflaştırılması .....	72
5.13. VGLUT2::Chr2-EYFP transgenik fare soyunun vagal stimülasyonu ve EKG kayıtları .....	72
5.13. Sinir Çapı Analizi .....	73
5.14. İstatistiksel analizler .....	73
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>74</b>
6.1. AKG özgü spinal afferentlerin belirlenmesinde kullanılacak transgenik fare soylarının belirlenmesi, üretilmesi ve doğrulanması .....	74
6.1.1. AKG nöronlarına özgü gen ifadelerinin doğrulanması .....	75
6.1.2. Kalbe özgü AKG afferentlerin görüntülenmesinde kullanılan transgenik farelerin temini, üretimi ve genotiplemesi .....	76
6.1.3. Ticari olarak temin edilen AKG özgü transgenik fare soylarında transgen ifadelerinin periferik gangliyonlarda doğrulanması .....	77
6.1.4. İkili transgenik fare kullanılarak AKG kökenli afferent inervasyonunun kalp yüzeyinde 3B haritalanması .....	79
6.2 Afferentlerin bütünsel (spinal-vagal) görüntülenmesinde ve fonksiyonel analizlerde kullanılacak fare soyunun üretilmesi ve doğrulanması .....	86
6.2.1 VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farenin üretimi ve genotiplemesi ...	86

6.2.2 VGLUT2::ChR2 ikili transgenik farenin üretimi ve genotiplemeesi .....	87
6.2.3 İkili Transgenik Farelerin Periferik Gangliyonları, Omurilik Ve Beyin Sapında Transgen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi .....	87
6.3. Kalbin Afferent Ağının Görüntülenmesi İçin Optimizasyon Çalışmaları .....	92
6.3.1. Kalbin afferent inervasyonunun görüntülenmesinde gerçekleştirilen optimizasyonlar .....	92
6.3.2. Şeffaflaştırma yöntemi optimizasyonları ve görüntü derinlik analizleri..	95
6.4. Kalbin 3B Efferent ve Afferent İnervasyonunun Vahşi Tip ve Transgenik Fare Soylarında Haritalanması .....	99
6.4.1. Kalbin afferent inervasyonunun transgenik fare soyları kullanılarak haritalanması .....	100
6.5. Atriyum ve Ventriküllerdeki Kardiyak Afferent Ağ ve Sinir Ucu Morfolojilerinin Detaylı Değerlendirilmesi .....	107
6.6. Kalbin Genel, Sempatik ve Duyusal İnervasyonunun Görüntülenmesi.....	110
6.6.1. Kalbin TUJ1 pozitif fiber genel inervasyonunun haritalanması .....	111
6.6.2. Kalbin TH-IR sempatik inervasyonunun haritalanması.....	114
6.6.3. Kalbin VGLUT2 ifade eden afferent inervasyonunun sempatik ve genel inervasyon ile birlikte görüntülenmesi.....	114
6.7. Spinal ve Vagal Kökenli Duyu Nöronlarının Kalp Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Optogenetik Yöntemlerle Tanımlanması .....	119
6.7.1. Kanalrodopsin üretimi viral yöntemle gerçekleştirilerek AKG kökenli duyu nöronlarının işaretlenmesi ve fonksiyonel olarak değerlendirilmesi .....	120
6.7.2. Transgenik fare modellerinde kalbe özgü duyu nöronlarının fonksiyonel olarak değerlendirilmesi.....	123
6.8. MI Sonrası Kardiyak Afferent, Sempatik Global Sinir Ağının Yeniden Modellenmesi .....	126
6.8.1 MI Modeli Optimizasyonları.....	127
6.8.2 MI Sonrası Kardiyak Afferent Ağının Yeniden Modellenmesinin Görüntülenmesi .....	129
6.8.3 MI Sonrası Kardiyak Bütüncül Sinir Ağının Yeniden Modellenmesinin Görüntülenmesi .....	131



6.8.4 MI Sonrası Kardiyak Sempatik Ağının Yeniden Modellenmesinin Görüntülenmesi .....	132
<b>7. TARTIŞMA .....</b>	<b>134</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>146</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>147</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>168</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>172</b>



## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AKG:</b>	Arka kök gangliyonu
<b>AP:</b>	Aksiyon potansiyeli
<b>AV:</b>	Antrio ventriküler
<b>ChAT:</b>	Kolin asetiltransferaz
<b>ChR2:</b>	Channelrhodopsin-2
<b>Cre:</b>	Cre rekombinaz
<b>Di-8-ANEPPQ:</b>	1-(3-Trimethylammoniopropyl)-4-[-[2-(di-n-octylamino)-6naphthyl] vinyl]pyridinium dibromide
<b>DMV:</b>	Dorsal motor vagal çekirdek
<b>EKG :</b>	Elektro kardio grafi
<b>EpKG:</b>	Epikardiyal gangliyon
<b>HRP:</b>	horseradish peroxidase dye
<b>IKG :</b>	İntrinsik kardiyak gangliyonları
<b>IR:</b>	İmmün reaktivite
<b>IP / ip:</b>	İntra peritoneal
<b>IT / it:</b>	İntra tekal
<b>LAD:</b>	Left anterior descending
<b>MI:</b>	Miyokardial infarktüs
<b>Mrgprd:</b>	Mas-related G-protein coupled receptor member D
<b>MSS:</b>	Merkezi sinir sistemi
<b>NA:</b>	Nukleus ambuguus
<b>NG:</b>	Nodoz gangliyon
<b>3B:</b>	3 boyut
<b>PSS:</b>	Sinir sistemi periferik
<b>Pvalb:</b>	Parvalbumin
<b>PZR:</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>q-RTPZR:</b>	Kantitatif- gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>rAAV2 :</b>	Recombinant Adeno Associatate Virus
<b>RFP:</b>	Red Fluorescence Protein
<b>SA:</b>	Sinatrial düğüm

<b>SG:</b>	stellat gangliyon
<b>SIF:</b>	Küçük yoğun floresan hücreler
<b>TH:</b>	Tirozin hidroksilaz
<b>TUJ1:</b>	Beta tubulin III
<b>VGLUT2:</b>	Vesicular glutamate transporter type 2
<b>VGLUT3:</b>	Vesicular glutamate transporter type 3
<b>VSS:</b>	Vagus sinir stimülasyonu



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 5.1</b>	Transgenik farelerin genotiplenmesinde kullanılan sarflar.....	45
<b>Tablo 5.2</b>	<i>In vivo</i> operasyonlarda kullanılan alet, sarf ve kimyasallar .....	46
<b>Tablo 5.3</b>	qRT-PCR işleminde kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar .....	46
<b>Tablo 5.4</b>	İmmun boyamalarda ve görüntülemede kullanılan malzemeler .....	46
<b>Tablo 5.5</b>	Görüntülemede Kullanılan Antikorlar .....	47
<b>Tablo 5.6</b>	Bakteri çoğaltma ve virüs yapımında kullanılan malzemeler .....	48
<b>Tablo 5.7</b>	Analiz ve görüntülemede kullanılan cihaz ve yazılımlar .....	49
<b>Tablo 5.8</b>	Transgenik hatların genlerinin ekspresyonlarının kalbe özgü AKG'lerde q-RT-PCR ile doğrulanması .....	51
<b>Tablo 5.9</b>	Ticari olarak temin edilen farelerin RNA seviyelerinin ölçülmesinde kullanılan qRT-PCR primer sekansları .....	51
<b>Tablo 5.10</b>	Ticari olarak temin edilen transgenik fareler .....	52
<b>Tablo 5.11</b>	Transgenik hatların genotiplenmesinde kullanılan primerler .....	53
<b>Tablo 5.12</b>	Genotipleme PZR protokolü .....	53
<b>Tablo 5.13</b>	AKG diseksiyon ve hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri.....	55
<b>Tablo 5.14</b>	İmmünokimyasal boyamalarda kullanılan solüsyonların içerikleri .....	57
<b>Tablo 5.15</b>	scaleCUBIC işleminde kullanılan solüsyonlar.....	60
<b>Tablo 5.16</b>	Solunum cihazında kullanılan değer tablosu. Hayvanın kilosuna göre ayarlanan solunum hacmi ( $\mu$ l) ve solunum hızı (bpm) değerleri .....	68
<b>Tablo 5.17</b>	Virüs üretiminde kullanılan vektörler .....	70

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 Nöronal aksiyon potansiyeli. Kesikli çizgi eşik voltajını temsil etmektedir	7
Şekil 4.2 Nöronal izleme yönleri. ....	9
Şekil 4.3 Periferden beyne giden ağrı yolları.....	14
Şekil 4.4 QT aralığının moleküler ve elektrofizyolojik temeli .....	18
Şekil 4.5 Kardiyak nöral kontrolün şematik görüntüsü. ....	20
Şekil 4.6 Kalp-sinir sistemi etkileşimi. ....	23
Şekil 4.7 Kardiyak gangliyon pleksuslar. ....	30
Şekil 4.8 İnervasyonlarına göre sınıflandırılan üç tip SIF hücresi.....	32
Şekil 4.9 Miyokardın çok hücreli yapısı .....	33
Şekil 4.10 Uzun sitoplazmik projeksiyonlara (telopodlar) sahip bir telositin (TC) tipik morfolojisi .....	34
Şekil 4.11 Aksiyon potansiyelinin optogenetik kontrolü.....	37
Şekil 4.12 Birden fazla bölgede beyin-kalp ekseninin optogenetik sorgulaması. ....	39
Şekil 4.13 Cre-loxP sisteminin mekanizması .....	42
Şekil 4.14 Cre-loxP sisteminin çalışma sistemi (Jax lab).....	43
Şekil 4.15 Dokuya özgü transgenik fare üretiminde cre-loxP sisteminin kullanılması (Jax lab).....	44
Şekil 5.1 Tez çalışmasının grafiksel özeti.....	45
Şekil 5.2 Gangliyon diseksiyonu .....	55
Şekil 5.3 Görüntüleme için doku hazırlama .....	56
Şekil 5.4 Görüntüleme işlemi için kalbin hazırlanma basamaklarını gösteren diyagram .....	61
Şekil 5.5 Görüntüleme için kullanılan agar bazlı kalıp.....	61
Şekil 5.6 Trakeostami .....	62
Şekil 5.7 Torakotomi .....	63
Şekil 5.8 Kalbe enjeksiyon .....	64
Şekil 5.9 İntratekal enjeksiyon.....	64
Şekil 5.10 AKG gövdesine enjeksiyon .....	65
Şekil 5.11 Vagatomi.....	66
Şekil 5.12 Transgenik farelerden EKG kaydı alınması .....	67

<b>Şekil 5.13</b> Elektrokardiyografi eğrisi. EKG kayıtlarında normal ST-segmenti (sol panel), ST-segment yükselmesi (orta panel) ve ST-segment düşmesi gösterimi (171). .....	67
<b>Şekil 5.14</b> Miyokardiyal infarktüs operasyonunda kullanılan cerrahi aletler. ....	69
<b>Şekil 5.15</b> LAD bağlanarak Miyokard infarktüs modeli oluşturulması.....	69
<b>Şekil 5.16</b> Retro-orbital enjeksiyon (173).....	72
<b>Şekil 6.1</b> Kalbe özgü işaretli AKG ve NG mRNA örneklerinde qRT-PCR analizi ile gen ifadelerinin değerlendirilmesi.....	75
<b>Şekil 6.2</b> Üretim sonucu elde edilen ikili transgenik farelerin genotip agaroz jel görüntüsü.....	76
<b>Şekil 6.3</b> NG ve AKG ganglionlarında Pvalb, VGLUT3 ve Mrgprd ekspresyonunun değerlendirilmesi.....	78
<b>Şekil 6.4</b> It 4-OH-Tamoxifen enjeksiyonu sonrası NG ve AKG ganglionlarında Mrgprd ekspresyonunun değerlendirilmesi.....	79
<b>Şekil 6.5</b> Mrgprd::tdTomato transgenik farenin ip tamoxifen uygulamasından 30 gün sonra disekte edilen kalbin görüntüleri. ....	80
<b>Şekil 6.6</b> Mrgprd::tdTomato transgenik farenin it tamoxifen uygulamasından 10 hafta sonra disekte edilen kalbin görüntüleri. ....	81
<b>Şekil 6.7</b> VGLUT3::tdTomato transgenik fare kalbinin görüntülenmesi .....	82
<b>Şekil 6.8</b> NG2 <sup>cre</sup> ;Ai9 ikili transgenik fare kalbinin dorsal ve ventral yönlerinin görüntülenmesi.....	83
<b>Şekil 6.9</b> GFAP <sup>cre</sup> ;Ai9 ikili transgenik fare kalbinin dorsal ve ventral yönlerinin görüntülenmesi.....	84
<b>Şekil 6.10</b> Pvalb::tdTomato ikili transgenik fare kalbinin anti-RFP immüno işaretlenmesi sonrası görüntülenmesi .....	85
<b>Şekil 6.11</b> Çaprazlama sonucu elde edilen VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farelerin genotip jel görüntüsü .....	86
<b>Şekil 6.12</b> Çaprazlama sonucu elde edilen VGLUT2::ChR2-EYFP ikili transgenik farelerin genotip jel görüntüsü .....	87
<b>Şekil 6.13</b> VGLUT2 <sup>Cre</sup> ; Ai9 transgenik farenin tüm periferik ganglionlarında VGLUT2 ekspresyonu için tdTomato raportör proteininin görüntülenmesi .....	89

<b>Şekil 6.14</b> VGLUT2-Cre::ChR2-EYFP farenin AKG ve NG'de ChR2-eYFP füzyon proteininin ifadesinin görüntülenmesi.....	90
<b>Şekil 6.15</b> VGLUT2 <sup>Cre</sup> ; Ai9 transgenik farenin omurilik ve beyin sapından alınan kesitlerin tdTomato ifadesinin görüntüleri.....	91
<b>Şekil 6.16</b> Görüntülemeye uygulanan optimizasyonların listesi.....	92
<b>Şekil 6.17</b> VGLUT2-Cre::tdTomato transgenik fare kalbinin endojen tdTomato sinyali (5x, LSM880).....	93
<b>Şekil 6.18</b> TUJ1 birincil ve Alexa sekonder antikoruna ile immünokimyasal olarak işaretlenen aksonların 3 farklı mikroskopta 3B görüntülenmesi.....	94
<b>Şekil 6.19</b> VGLUT2::tdTomato kalbin ventrikül yüzeyinde anti-RFP birincil antikoruna ve Alexa-Fluor veya Alexa Fluor PLUS ikincil antikoruna ile işaretlenen glutamaterjik akson görüntüleri.....	95
<b>Şekil 6.20</b> iDISCO yöntemi ile şeffaflaştırılan kalbin miyokard görüntüsü.....	96
<b>Şekil 6.21</b> THY1-EGFP transgenik fare beyнинin şeffaflaştırma sonrası görüntüsü. 97	
<b>Şekil 6.22</b> CUBIC şeffaflaştırma yöntemi sonrası vahşi tip anti-TUJ1 boyalı kalbin 5X global görüntüsü.....	98
<b>Şekil 6.23</b> VGLUT2::tdTomato ikili transgenik fare kalbinin anti-RFP birincil ve anti-488 Alexa Plus ikincil antikoruna ile yapılan immüno boyamayı takiben ventrikül bölgesinde direkt ve şeffaflaştırma uygulaması sonrası görüntüler.....	99
<b>Şekil 6.24</b> NeuTube 1.0 programı ile görüntü analizi.....	101
<b>Şekil 6.25</b> VGLUT2 <sup>Cre</sup> ;Ai9 transgenik farelere ait kalplerin tdTomato endojen floresan sinyalinin immünokimyasal yöntemle artırılarak dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) yüzlerinin 5X büyütmede maksimum projeksiyon görüntüleri .....	103
<b>Şekil 6.26</b> VGLUT2 <sup>Cre</sup> ;Ai9 transgenik farelere ait kalplerin dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) görüntülerinin akson çapı analiz görüntüleri.....	104
<b>Şekil 6.27</b> VGLUT2 <sup>Cre</sup> ; Ai9 transgenik kalbinde kardiyak duyuşal inervasyonun 3B gösterimi.....	107
<b>Şekil 6.28</b> Atriyumlardaki afferentlerin ve sinir uçlarının ayrıntılı karakterizasyonu .....	108
<b>Şekil 6.29</b> Ventriküllerdeki duyuşal liflerin ve sinir uçlarının ayrıntılı karakterizasyonu .....	109
<b>Şekil 6.30</b> Kalpteki duyuşal liflerin ve sinir uçlarının ayrıntılı karakterizasyonu ...	110

<b>Şekil 6.31</b> C57BL/6J vahşi tip farelerin kalbinin dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) yüzünde anti-TUJ1 antikoru ile tüm inervasyonun global görünümü .....	112
<b>Şekil 6.32</b> C57BL/6J vahşi tip farenin kalbinde 3B kardiyak inervasyonunun dorsal ve ventral yüzde karşılaştırmalı analizi.....	113
<b>Şekil 6.33</b> TH-IR sempatik liflerin liflerinin C57BL/6J vahşi tip kalplerin dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) yönünde genel görünümü .....	114
<b>Şekil 6.34</b> TUJ1-IR ve VGLUT2 eksprese eden RFP-IR işaretli afferentlerin birlikte 3B inervasyonu.....	116
<b>Şekil 6.35</b> TH-IR sempatik lifler ve VGLUT2 Cre bağımlı tdTomato ifade eden RFP-IR afferentlerin birlikte inervasyonu.....	118
<b>Şekil 6.36</b> VGLUT <sup>Cre</sup> ;Ai9 transgenik fare kalbinin ventrikülünde afferent ve efferent sinir lifinin birlikte görüntülenmesi .....	119
<b>Şekil 6.37</b> VGLUT-Cre transgenik farenin kalbine virüs enjeksiyonu sonrası AKG gangliyondan dallanan aksonların optogenetik olarak uyarılmasının şematik gösterimi. ....	120
<b>Şekil 6.38</b> VGLUT <sup>Cre</sup> ;ChR2-EYFP transgenik farenin vagus sinirinin optogenetik olarak uyarılmasının şematik gösterimi. ....	120
<b>Şekil 6.39</b> Üretilen AAV-PHP.S-chr2-eYFP virüsler ile <i>in vitro</i> ortamda enfekte edilmiş VGLUT2-Cre transgenik fareden izole edilen AKG nöronları.....	122
<b>Şekil 6.40</b> VGLUT2-Cre transgenik fareye intratekal PHP.S_ChR2_eYFP virüs enjeksiyon sonrası AKG doku görüntülenmesi.....	123
<b>Şekil 6.41</b> VGLUT2-Cre transgenik farenin kalbine RetroAAV_ChR2_eYFP virüs enjeksiyonu sonrası doku takibi .....	123
<b>Şekil 6.42</b> VGLUT2-Cre:ChR2 transgenik farede vagal demetinin optogenetik uyarımının kalp atımına etkisinin EKG ile gösterimi .....	125
<b>Şekil 6.43</b> MI modelinin grafiksel ve kalp üzerinde gösterimi.....	127
<b>Şekil 6.44</b> Farelerin elektrokardiyogramı (EKG) .....	128
<b>Şekil 6.45</b> VGLUT2::ChR2 transgenik fare kalbinde LAD bağlama ile oluşturulan miyokard infarktüsün farklı zamanlarda değerlendirilmesi. ....	128
<b>Şekil 6.46</b> VGLUT2::ChR2 transgenik fare kalbinde LAD bağlama ile oluşturulan MI sonrası oluşan kas hasarının görüntülenmesi. ....	129
<b>Şekil 6.47</b> MI sonrası yeniden şekillenen afferentlerin görüntülenmesi.....	131



<b>Şekil 6.48</b> VGLUT2 <sup>Cre</sup> ;Ai9 transgenik fare kalplerinin ventral yönde MI bölgesinin sağlıklı alan veya kalplerle karşılaştırmalı analizleri .....	131
<b>Şekil 6.49</b> Ventral yüzdeki (solda) TUJ1-IR liflerinin genel görünümü ve sinir çapı ölçümleri için (sağda) türetilmiş renk kodlu harita. ....	132
<b>Şekil 6.50</b> MI sonrası sempatik efferent yeniden şekillenme. ....	133



## 1. ÖZET

### KALBE ÖZGÜ DUYU NÖRONLARININ TRANSGENİK YAKLAŞIM KULLANILARAK SAĞLIKLI VE İSKEMİK HASAR SONRASI FARE KALBİNDE İNCELENMESİ

Duyusal sinir sistemi, kalp fonksiyonunun regülasyonunda kritik öneme sahiptir. Otonom sinirlerin kalbi inervasyonu ve fonksiyonu hakkında birçok çalışma olmakla beraber, kalbin afferent inervasyonu konusunda bilginiz yetersizdir. Literatürdeki bu eksikliği gidermek ve afferentlerin sağlıklı ve miyokard infarktüs (MI) sonrası kalbe inervasyonunu 3 boyutlu (3B) tüm kalpte haritalamak amacıyla tez kapsamında VGLUT2-Cre::tdTomato ikili transgenik fare soyu üretildi ve ileri yöntemler kullanılarak görüntüledi. VGLUT2 ifade eden spinal ve vagal kökenli kardiyak afferentlerin haritasını kalbin dorsal ve ventral yüzlerinde daha önce gösterilmemiş yüksek çözünürlükte ve 3B görüntüledik. Kalbin dorsal yüzünde ventrale oranla anlamlı şekilde daha yoğun afferent inervasyonunun olduğunu tespit ettik ( $p=0.004$ ). Afferent ve efferent karşılaştırmalı 3B kardiyak haritalarını oluşturduğumuz çalışmamızda nöron çapı analizlerinde  $\sim 5\mu\text{m}$ 'den kalın fiberlerin dorsal yüzde istatistiksel anlamlı olarak yoğun olduğu tespit edildi ( $p=0.01$ ). Atriyum ve ventriküllerin ayrıntılı karakterizasyonu sonucunda, çiçek benzeri sonlanmalar, kas içi uçlar ve kalbin farklı anatomik kısımlarını inerve eden serbest sinir ucu gibi afferent sinir sonlanma morfolojileri yüksek çözünürlükte tespit edildi. VGLUT2::tdTomato transgenik fare kalplerinde TUJ1 immün boyama ile saptanan global sinir inervasyonunun %20-30'unun VGLUT2 ifade eden afferentler ile örtüştüğü tespit edildi. Sağlıklı ve iskemik hasar sonrası kalbin afferent ve efferent inervasyonunu karşılaştırmak amacıyla oluşturulan MI modelinde, hasar sınır bölgesinde hiperinervasyon ve infarktüs alanına uzak bölgelere kıyasla afferent yoğunluğunda istatistiksel bir artış olduğunu gösterdik ( $p<0.003$ ). Bu bulgular, iskemik hasar sonrası afferent ağdaki değişimin kardiyak disfonksiyon ve mortaliteye etki edebileceğini düşündürmektedir. Bu tez kapsamında üretilen VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farelerde 3B kalp görüntüleme tekniklerinde yapılan gelişmeler ile vagal ve spinal afferentlerin büyük çoğunluğunu temsil eden VGLUT2 ifadeli aksonların atriyum ve ventrikül özelinde sağlıklı ve MI sonrası inervasyon paternleri detaylı olarak gösterilmiştir. Bu tezde elde edilen sonuçlar, nörokardiyak ağın afferent inervasyonu tanımlaması yönü ile literatürdeki önemli bir bilgi eksikliğini giderilmesine önemli katkı sağlamakla beraber, gelecekte yapılacak çalışmalarda afferent ağın özellikle iskemik hasar ve diğer kardiyak anomalilerde etkisinin fonksiyonel araştırmaları için değerli bir alt yapı oluşturmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Afferent Kardiyak İnervasyon, Miyokardiyal İnfarktüs, Nöral Yeniden Şekillenme, Tüm Organ Görüntüleme, VGLUT2-Cre Transgenik Fare.

\*Bu araştırma TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 219S332 numaralı Proje kapsamında desteklenmiştir.

## 2. ABSTRACT

### INVESTIGATION OF HEART SPECIFIC SENSORY NEURONS USING A TRANSGENIC APPROACH IN A HEALTHY AND AFTER ICHEMIC DAMAGE MOUSE HEART

The sensory nervous system is critical in the regulation of heart function. Although there are many studies on cardiac innervation and function of autonomic nerves, our knowledge on afferent innervation of the heart is insufficient. In order to fill this gap in the literature and to map the innervation of afferents to the healthy and post-myocardial infarction (MI) heart in 3D (3D) whole heart, VGLUT2-Cre::tdTomato double transgenic mouse strain was produced and imaged using advanced methods. We visualized a map of spinal and vagal-derived cardiac afferents expressing VGLUT2 on the dorsal and ventral side of the heart in high resolution and 3D that has not been shown before. We found that there was significantly more intense afferent innervation on the dorsal side of the heart compared to the ventral side ( $p=0.004$ ). In our study, in which we visualized whole cardiac afferent and efferent innervation, in neuron diameter analyzes fibers thicker than  $\sim 5\mu\text{m}$  were found to be statistically significant on the dorsal side ( $p=0.01$ ). As a result of detailed characterization of atria and ventricles, spinal afferent nerve ending morphologies such as flower-like endings, intramuscular endings and free nerve endings innervating different anatomical parts of the heart were detected with high resolution. In VGLUT2::tdTomato transgenic mouse hearts, 20-30% of global nerve innervation detected by TUJ1 immunostaining was found to overlap with VGLUT2 expressing afferents. To compare the afferent and efferent innervation of the healthy and post-ischemic heart, we generated mouse MI model. We showed that there was statistical increase in afferent hyperinnervation in the injury border zone when compared to the regions far from the infarct area ( $p<0.003$ ). These findings suggest that the change in the afferent network after ischemic injury may affect cardiac dysfunction and mortality. In the VGLUT2::tdTomato double transgenic mice produced within the scope of this thesis, the developments in 3D cardiac imaging techniques; the innervation patterns of VGLUT2 expressed axons, which represent the majority of vagal and spinal afferents, in healthy and MI hearts' atria and ventricles have been shown in detail. The results obtained in this thesis, besides making an important contribution to the elimination of an important lack of knowledge in the literature in terms of the definition of afferent innervation of the neurocardiac network, formed a valuable infrastructure for the functional studies of the effect of the afferent network, especially in ischemic damage and other cardiac anomalies, in future studies.

**Keywords:** Afferent Cardiac Innervation, Myocardial Infarction, Neural Remodeling, Whole Organ Imaging, VGLUT2-Cre Transgenic Mouse.

\*This study was supported by TÜBİTAK under 1001 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 219S332.

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Sensoriyel nöron hücre gövdeleri, omuriliğe bitişik bulunan arka kök gangliyonlarında (AKG) ve jugular foramende bulunan nodoz gangliyonda (NG) yer alırlar. AKG nöronları hem periferdeki doku ve organlara hem de omuriliğe uzanan aksonal dalları olan yalancı tek kutuplu bir morfolojiye sahiptir. Afferent olarak adlandırılan duyu nöronları viseral organlardan ve periferden duyu bilgisini almak için özelleşmiş sonlanma tipleri ile acı, basınç, gerilme, dokunma ve mekanik uyarılar gibi çeşitli duyu bilgilerini beyne aktarırlar. Spinal projeksiyon nöronları daha sonra aldıkları bilgiyi, sinyallerin algılanabileceği beyindeki daha yüksek merkezlere iletir (1). Duyu nöronlarının perifer doku ve viseral organlardan merkezi sinir sistemine taşıdığı duysal bilginin moleküler ve fonksiyonel karakteri özellikle klinikte ağrı tedavilerine yeni yaklaşımlar oluşturması açısından araştırılmaktadır (2-4). Kalp inerve eden duyu nöronlarının AKG veya NG'den köken aldığı bilinmekle birlikte taşıdığı duysal bilginin kapsamına dair moleküler ve fonksiyonel mekanizmalar net olarak bilinmemektedir. Kalbin sağ üst atriyumunda bulunan sinoatriyal düğüm kalp ritmini, iletim hızını, miyokardiyal kasılmayı ve gevşemeyi kontrol eden otonom sinir sistemi aksonları tarafından inerve edilmektedir (5,6). Otonom sempatik ve parasempatik sinirlerinin merkezi sinir sisteminden kalbe projeksiyonları bulunmaktadır. (6,7).

Afferent projeksiyonlarının morfolojik ve fonksiyonel araştırmaları özellikle vagal kökenli nöronlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Vagal afferentlerin viseral organları, damarları ve sindirim kanalının çeşitli alanlarını inerve ettiği, sindirim, tokluk, solunum, kan basıncı ve kalp hızı gibi fonksiyonların çalışmasında ve homeostazın korunmasında işlevleri olduğu bilinmektedir (8-11). İç organların afferent inervasyonlarının niteliğinin vagal veya spinal köken olarak ayrıştırılması üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (12). Afferent sonlanmaların moleküler, fonksiyonel ve morfolojik karakterleri kalpten aldığı duyu bilgisine göre çeşitlilik göstermektedir. Çiçek benzeri sonlanmalar (flower spray), kas içi sonlanmalar (intra muscular arrays), dallanma tipi uç sonlanmaları (branching type end-net meshes) ve ayrıca tek akson dalları (single axon branches) gibi farklı morfolojilere sahip aksonal sonlanmalar viseral organlarda çeşitli işaretleyiciler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır (10,13-15). Viseral organ veya dokularda görüntülenen ve fonksiyonel tanımlamaları

yapılmaya çalışılan çiçek benzeri sonlanmaların baroreseptör veya mekanoreseptör özellikte oldukları gösterilmiştir (16–19). Çiçek benzeri sonlanmalardan farklı olarak intramuskular sonlanmaların tespiti ile ilgili daha az çalışma mevcuttur (20,21). Kalpte kas yoğunluğu nedeni ile oluşan otofloresan arka plan (background) etkisi, sinir ağının kas içi sonlanmalarının belirlenmesini zorlaştırmış, ilgili bilginin literatürde kısıtlı kalmasının sebeplerinden biri olmuştur.

Yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen kardiyovasküler hastalıklar dünya genelinde ölümlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Kardiyak patolojiler arasında klinikte sıklıkla karşılaşılan iskemik hasar sonucu gelişen inervasyondaki değişiklikleri belirlemek, afferentler ve efferentler arasındaki fonksiyonel geri besleme döngülerinin düzensizliği ve patolojik bulgular ile moleküler ve fonksiyonel ilişkiyi kurmak açısından önemlidir. Sempatik sinir yeniden yapılanma (remodeling), çeşitli hayvan modellerinde (22–24) ve insanlarda (25) iyi tanımlanmış olmakla beraber, duyuşal ağın yeniden şekillenip miyokard infarktüs (MI) sonrası aritmogeneze ne ölçüde katkıda bulunduğu belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle MI sonrası sempatik ve duyuşal inervasyonun haritalanması patolojik mekanizmanın anlaşılması ve yeni bir yaklaşımla tedavi yöntemleri geliştirilebilmesine ışık tutacaktır. Bu tez çalışmasında kalbe dallanan vagal ve spinal afferentlerin sağlıklı ve MI sonrası kalbin yüzeyindeki konumları, yayılımı, sonlanma biçimleri ve otonom sinir sistemi ile etkileşiminin belirlenmesi için transgenik fare yaklaşımı ve immünboyama yöntemleri, ileri görüntüleme teknikleri ile birleştirilerek kullanıldı.

Kalbin miyokard dokusundan kaynaklanan yüksek otofloresan, bütünsel haritalama amacı ile kullanılacak spesifik immünokimyasal belirteçlerin olmaması, tüm kalp ölçeğinde doku berraklaştırma tekniklerinin kısıtlılıkları, kalbi inerve eden afferent ve efferentlerin 3-boyutlu (3B) haritalanmasını sınırlamıştır. Literatürde henüz kardiyak afferentlerin görüntülenmesi tüm kalp kapsamında gerçekleştirilmemişken, atriyum (26), sinoatriyal düğüm (27) ve aort (17) gibi belirli birkaç anatomik alanda inervasyon gösterilebilmiştir. Bu tez kapsamında, uyarıcı glutamaterjik nöronları ve sinir uçlarını floresan olarak etiketlemek için VGLUT2-IRES-Cre transgenik fare soyları kullanılarak, sağlıklı ve deneysel olarak MI hasarı geliştirilen farelerde AKG ve NG'den köken alan kardiyak afferentlerin 3B kalpte dorsal ve ventral yüzlerde görüntülenerek yüksek çözünürlükte haritalanması

gerçekleştirildi. Ayrıca ürettiğimiz VGLUT2::tdTomato ikili transgenik fare kalplerinin atriyum ve ventriküllerinin dorsal ve ventral yüzlerinde farklı morfolojilere sahip akson liflerinin ve sinir uçlarının sınıflandırılması hedeflendi.

Bu tez kapsamında temel amaçlarımız:

1. Kalbe özgü duyu nöronlarının ifade ettiği genlerin belirlenip spinal kökenli afferentlerin görüntülenmesinde kullanılacak transgenik soyların moleküler karakterizasyon yöntemleri ile belirlenmesi,
2. Fare kalbine dallanan duyu nöron ağının haritalanması, dağılım, sonlanma tipleri ve derinliklerinin 3B olarak belirlenmesi,
3. Elde edilen kardiyak afferent ağ haritası ile kardiyak efferent ve genel sinir ağının karşılaştırılması,
4. Kardiyak afferentlerin aksonal sonlanma morfolojileri ve tiplerinin sınıflandırılması ve görüntülenmesi,
5. Kardiyovasküler hastalık modeli olarak MI sonucu oluşan iskemik hasar sonrası duyu nöronlarının kalpteki dallanmasının nasıl etkilendiğinin karşılaştırmalı araştırılmasıdır.

Bu tez çalışmasında, kalbin 3B görüntüsünün elde edilebilmesi için dorsal ve ventral yüzlerinin bütüncül çekimleri ventrikül ve atriyumlar hakkında detaylı bilgi verecek şekilde gerçekleştirildi. Kalbin sinir fiber ve aksonal sonlanma morfolojilerinin görüntülerinin oluşturulması için uygulanan teknik optimizasyonlar kalbin arka plan sinyal yoğunluğunun üstüne çıkarak yüksek çözünürlükte veriler elde edilmesine olanak sağladı. 3B, yüksek çözünürlükte görüntülenen kalbin afferent, sempatik efferent ve bütüncül inervasyonlarının yoğunluğu ve akson çapları dorsal ve ventral yüzde karşılaştırmalı olarak hesaplandı. Literatürde kalbin ventral inervasyonunun detayları hakkında sınırlı veri (28) olması nedeni ile bu tez çalışmasında elde edilen glutamaterjik, noradrenerjik ve genel sinir ağının işaretlenerek detaylı incelenmesi bu eksikliği giderecektir. Tez kapsamında, kalbin çalışma mekanizmasında etkili duysal geri bildirim ve otonom sinir sistemi ile afferent sistemin sağlıklı ve MI sonrası hasar durumunda oluşturduğu hiperinervasyon ve denervasyon konusunda yeni bilimsel veriler sunulmaktadır. Kalbin sinir sistemi ile olan ilişkisinin detaylı tanımlanması, hastalık mekanizmalarının açıklanması ve ileride yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. Sinir Sistemi**

Sinir sistemi, beyin ile iç organlar da dahil olmak üzere vücudun geri kalanı arasında sinyal iletimini sağlar. Bu şekilde sinir sistemi hareket etme, nefes alma, görme, düşünme ve daha fazlasını kontrol eder. Sinir sisteminin temel birimi bir sinir hücresi veya nörondur. Farklı nöron tipleri farklı aktiviteleri kontrol eder veya gerçekleştirir. Örneğin, motor nöronlar, hareket üretmek için beyinden kaslara mesajlar iletir. Duyusal nöronlar ışığı, sesi, kokuyu, tadı, basıncı ve ısıyı algılar ve bunlar hakkında beyne mesajlar gönderir. Sinir sisteminin diğer kısımları istemsiz süreçleri kontrol eder (Kandel, 2013). Bunlar, düzenli bir kalp atışının sağlanması, adrenalin gibi hormonların salınması, ışığa tepki olarak göz bebeğinin açılması veya kısılması ve sindirim sistemini düzenlemesi gibi çeşitlendirilebilir. Sinir sistemi, bir organizmanın çevresiyle etkileşime girmesini sağlayan karmaşık bir ağıdır. Çevresel uyaranları algılayan duyuşal bileşenler ve iskelet, kalp ve düz kas kontrolü ile hormonal salgıların kontrolünü sağlayan motor bileşenler, alınan uyaranlara veya duyuşal girdilere uygun motor yanıtları oluşturmak için bir sistem içinde koordine edilir, saklanır ve işlenir. İç organlardan ve diğer sistemlerden merkezi sinir sistemine bilgi aktaran nöronlara afferent (duyuşal, getirici), beyinde oluşan motor komutları organlara ve diğer dokulara aktaran nöronlara ise efferent (motor, götürücü) nöronlar denir. Sinir sistemi periferik (PSS) ve merkezi sinir sistemi (MSS) olmak üzere iki sisteme ayrılır.

### **4.2. Sinir hücresinde elektriksel ileti ve aksonal taşınma**

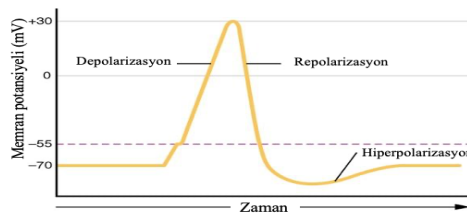
Sinir sinyali iletimi süreci, nöron/aksonun hücre zarı boyunca bir elektrik potansiyelinin oluşturulması ve korunmasıyla mümkün olur.

#### **4.2.1 Aksiyon potansiyeli**

Nöronların temel aktivitesi, kimyasal ve elektrik sinyallerini MSS'deki sinapslar yoluyla bir nörondan diğerine veya PSS'deki bağlantı kompleksleri ile nörondan bir kas hücresine etkili bir şekilde iletmektir. Membran potansiyeli, nöronal / aksonal hücre zarının içi ve dışı arasındaki voltaj farkıdır ve dinlenme potansiyeli olarak

adlandırılır (-70 mV). Bu potansiyel, bir membran pompası olan Sodyum / Potasyum-ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) tarafından oluşturulur ve korunur (Kandel, 2013). Bir nöron, nöronal hücre gövdesinden uzağa, bir akson boyunca bilgi ilettiğinde bir aksiyon potansiyeli ortaya çıkar. Hücre zarını depolarize eden ve dinlenme potansiyelinin 0mV'a doğru hareket etmesine neden olan bir olay tarafından bir aksiyon potansiyeli başlatılır. Depolarizasyon yaklaşık -50mV'lık bir eşik seviyesine ulaştığında, bir aksiyon potansiyeli meydana gelir (30).

Aksiyon potansiyeli, sodyum ve potasyum iyonlarının nöron hücre gövdesi/akson hücre zarı boyunca hareketinden kaynaklanır. Başlatıcı bir olayla ilk olarak sodyum kanalları açılır ve büyük konsantrasyonlarda sodyum iyonları hücre içi mikro çevreye girer. Membran potansiyelindeki bu değişiklik, voltaj kapılı katyonik kanalı (sodyum kanalı) açarak depolarizasyon ve nöronal aksiyon potansiyelinin oluşumu süreciyle sonuçlanır. Sodyum iyonları pozitif yüklü olduğundan, polarite daha pozitif hale gelir (-70mV ila -50mV) ve nöron/akson depolarize olur (Şekil 4.1). Potasyum kanalları, sodyum kanallarının kapanmasıyla eş zamanlı olarak depolarizasyon sürecinde daha sonra açılır. Potasyum iyonları hücreyi terk eder ve hücre dışı sıvıya girer. Bu olaylar, nöron/aksonun repolarizasyonuna ve membran  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pompası yoluyla dinlenme potansiyeline (-70mV) geri dönüşüne neden olur (15,31). Nöronal aksiyon potansiyelleri, belirli bir mesafeden bile herhangi bir sinir lifi boyunca uyarıların yayılması için hayati öneme sahiptir. Ayrıca sinaplar aracılığıyla nöronlar arasındaki iletişim için çok önemlidirler (31).



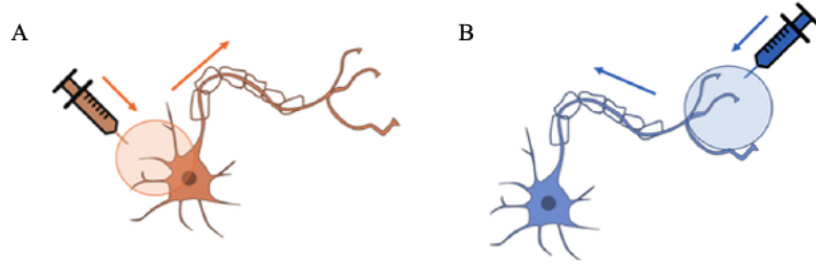
**Şekil 4.1** Nöronal aksiyon potansiyeli. Kesikli çizgi eşik voltajını temsil etmektedir (30).



#### 4.2.2. Aksonal taşıma

Aksonal taşıma, sinaptik vezikülleri, nörotransmitterler gibi proteinleri, lipid, mitokondriler ve diğer hücre organellerini nöron hücre gövdesinden akson yoluyla sinapslara taşımak ve daha sonra atık ürünleri hücre gövdesine geri getirmek için kullanılan hücresel bir mekanizmadır. Nöronda, biyolojik materyalleri aksonda yukarı ve aşağı olmak üzere iki farklı taşıma sistemi mevcuttur (Şekil 4.2). İleri taşınimli (anterograd) ve geri taşınimli (retrograd) izleme, nöronlardaki mevcut taşıma yollarından yararlanır. Anterograd taşıma tipik olarak mitokondri gibi organellerin yanı sıra aktin ve miyozin gibi makromoleküllerin ve transmitter sentezi için gerekli enzimlerin taşınmasında kullanılır. Retrograd taşıma ise, endositoz materyalinin veya bozunmayı hedefleyen moleküllerin taşınması için kullanılır. Bu iki yol aynı zamanda taşımayı kolaylaştırmak için farklı hücre iskeleti makinelerini kullanır: retrograd taşıma dinein motor proteini, anterograd taşıma kinesin proteini ile gerçekleşir (32).

Nöronal izleme deneylerinde, beyin dokusuna, uygulama bölgesinden hücre içi olarak yayılan ve dendritik ve aksonal uzantılar ve en önemlisi nöronların diğer uzak beyin alanlarına yaptığı her türlü bağlantı dahil olmak üzere tek tek nöronların morfolojisinin görselleştirilmesine yardımcı olan bileşikler enjekte edilir. Hangi beyin bölgelerinin birbirleriyle iletişim kurduğunu ve bunu nasıl yaptıklarını anlamak için bilgi akışı yönünde nöronları görüntülemek için bileşiklerin izlenmesi hedeflenir. Hedef organda aksonal işaretleme ve takip etme yöntemlerinde anterograd ve retrograd ilerleyen boyalar kullanılmaktadırlar. Bu işlem benzer şekilde periferdeki organların nöral ağlarının görüntülenmesinde de yaygın şekilde kullanılmaktadır (11,12,33–35). Anterograd izleme, nöronların hücre gövdelerinden aksonlarının uçlarına kadar ana hatlarını çizer; geriye dönük izleme olan retrograd izleme ise, nöronların aksonlarının terminallerinden hücre gövdelerine kadar zıt yönde ana hatlarını çizer (32).



**Şekil 4.2** Nöronal izleme yönleri. A. Sinir gövdesinden aksonlara doğru anterograd taşınım. B. Aksonlardan sinir gövdesine doğru retrograd taşınım (36).

### 4.3 Merkezi sinir sistemi

Merkezi sinir sistemi insan vücudunun işlem merkezi olarak kabul edilir. Beyin dört ana kısma ayrılır: (1) medulla, pons ve orta beyinden oluşan beyin sapı; (2) beyincik; (3) talamus ve hipotalamus ile birlikte diensefalın; ve (4) serebral korteks, bazal ganglionlar, beyaz cevher, hipokampi ve amigdaldan oluşan serebral hemisferler. Beynin en dıştaki en büyük tabakasını, buruşuk serebral korteksi ve merkezine doğru talamus, hipotalamus ve epifiz bezi gibi daha küçük yapıları içerir. Orta beyin, ön beyin ve arka beyin arasındaki hayati bağlantı noktası olarak hizmet eder. Beyni omuriliğe bağlayan beyin sapının üst kısmıdır. Arka beyin, medulla oblongata ve pons'tan oluşan beyin sapını ve serebellumu içeren beynin en alt arka kısmıdır.

Omurilik, MSS'nin kaudal uzantısıdır. Omurilik, bölümlere ayrılmıştır ve 31 çift omurilik siniri (afferent ve efferent bileşenlerle) yansıtır. Sekiz çift servikal spinal sinir, 12 çift torasik sinir, beş çift lumbal sinir, beş çift sakral sinir ve bir çift koksigeal sinir vardır (37).

Afferent sinirler duyu sinirlerini içerir ve deriden, eklemlerden, kaslardan ve iç organlardan gelen bilgileri taşır; efferent sinirler hem somatik hem de otonom motor sinirleri içerir ve iskelet, kalp ve düz kasları inerve eder, ayrıca glandüler doku ve salgı hücrelerini içerir. Omurilik, hem artan hem de azalan yollardan çevre ile MSS'nin geri kalanı arasındaki sinyalleri iletmekten sorumludur (37).

#### 4.4 Periferik sinir sistemi

PSS, vücut organlarını ve beyni birbirine bağlayan çok sayıda fizyolojik işlevi ve davranışı için gerekli sistemdir. PSS iki alt sistem içerir: duyuusal ve somatik sinirleri içeren somatik sinir sistemi ve istemsiz fizyolojik işlevleri kontrol eden otonom sinir sistemi. Anatomik olarak PSS, kraniyal sinirler, omurilik sinirleri ve vücut organları etrafındaki yerel sinir ağlarından oluşur (38,39). Beyinden kaynaklanan kraniyal sinirler, deri, kas, göz, dil, kulak, burun, gırtlak ve yutak gibi baş ve boyun bölgesindeki organları merkezi sinir sistemi ile bağlar. Başın altındaki organlar genellikle omurilik sinirleri tarafından inerve edilir. Görme, koku, tat, işitme ve denge gibi birçok temel spesifik duyuusal modalite, kraniyal sinirler tarafından taşınır. Dokunma, ağrı, sıcaklık ve viseral duyu dahil olmak üzere somatosensörler, kraniyal ve omurilik sinirlerindeki duyu lifleri tarafından da iletilir. Omurilik duyuusal lifleri, hücre gövdeleri AKG'de bulunan omuriliğin dorsal köklerinden geçer. Baş ve boyun bölgesindeki kas hareketleri kraniyal sinirler tarafından kontrol edilirken, alt gövdedeki efektör kaslarını doğrudan inerve eden spinal motor lifleri omuriliğin ventral köklerinden çıkar. Bazı kraniyal sinirler ve omurilik sinirleri sadece duyuusal veya motordur, diğerleri ise duyuusal, motor veya otonomik roller için bir lif karışımı içerir. Kranial sinirlerin bir üyesi olan vagus siniri (kraniyal sinir X veya CN X olarak da bilinir), üst ve alt gövdedeki organlara hem duyuusal (afferent) hem de motor (efferent) otonomik inervasyon sağlar (20). Viseral organları inerve eden vagus parasempatik (motor) lifler doğrudan beyin sapındaki dorsal motor vagal (DMV) çekirdekten çıkar. Öte yandan, sempatik nöronlar spinal sinirlerde bulunur. Omurilikten köken alan preganglionik nöronlar, bilateral simetrik sempatik zincir gangliyonlarında postganglionik hücre gövdeleri ile sinaps yaparlar. Bu tür postganglionik nöronlar daha sonra hedef iç organlarını kontrol etmek için uzun projeksiyonlar gönderir. PSS'nin bir başka büyük alt kümesi, insanda gastrointestinal sistemi kaplayan yaklaşık 500 milyondan oluşan yerel sinir ağları, enterik sinir sistemidir. (40). Kardiyovasküler sistem için de benzer sinir ağları tanımlanmıştır (41). Bu lokal nöral pleksuslar, duyuusal ve motor otonom sinir liflerinin yanı sıra viseral organlarla yoğun bir şekilde etkileşime girer. Lokal refleksler olarak bağımsız olarak işlev görebilirler ve organ fizyolojisini koordineli bir şekilde düzenlemek için sempatik ve parasempatik sinir sistemi ile birlikte çalışabilirler.

#### **4.4.1. Duyusal Sinir Sistemi**

Duyu nöronları beyne duyu bilgisini (acı, basınç ve gerilme gibi) taşıyan nöronlardır. Duyusal sinyaller, birincil afferent lifler tarafından periferden, bu afferentlerin spinal dorsal boynuz içerisindeki nöronlar ile sinaps yaptığı omuriliğin dorsal boynuzuna iletilir. Spinal projeksiyon nöronları daha sonra aldıkları bilgiyi, sinyallerin algılanabileceği beyindeki daha yüksek merkezlere iletir (1). Kalpten duyu bilgisini taşıyan nöronlar AKG veya NG'e yönelirler. Özellikle kalbin homeostazının sağlanmasında etkili olan duyu nöronlarının taşıdığı duyuusal bilginin moleküler ve fonksiyonel karakterizasyonu organlar bazında detaylıca araştırılmaktadır (2).

##### **4.4.1.1 Noduz Gangliyon**

Duyusal nöronların AKG, vagusun NG'de ve intrinsik kardiyak sinir sisteminin kendilerinde somataları vardır (42). Vagal afferentler iç organların ve sindirim kanalının çeşitli alanlarını inerve eder. Vagal duyu nöronlarını, aynı sinir kılıfında bulunan jugular gangliyon ve NG oluşturur. Bu gangliyon kompleksi, baş ve boğaz bölgelerinden ve hayati organların çoğuna kadar uzanan hedefleri inerve eden hem genel somatik hem de viseral duyu nöronlarını içerir. Bu vagal afferentlerin NG hücre gövdelerinde vardır ve bunlar beyin sapındaki soliter yolun çekirdeğine veya postrema alanına projeksiyon yapar. Vagus siniri yoluyla sindirim, tokluk, solunum, kan basıncı ve kalp hızı kontrolü ile ilgili çeşitli işlevlerde bedensel homeostazın korunmasında kritik bir role sahip duyuusal sinyaller aktarılmaktadır (43).

##### **4.4.1.2 Arka Kök Gangliyonu**

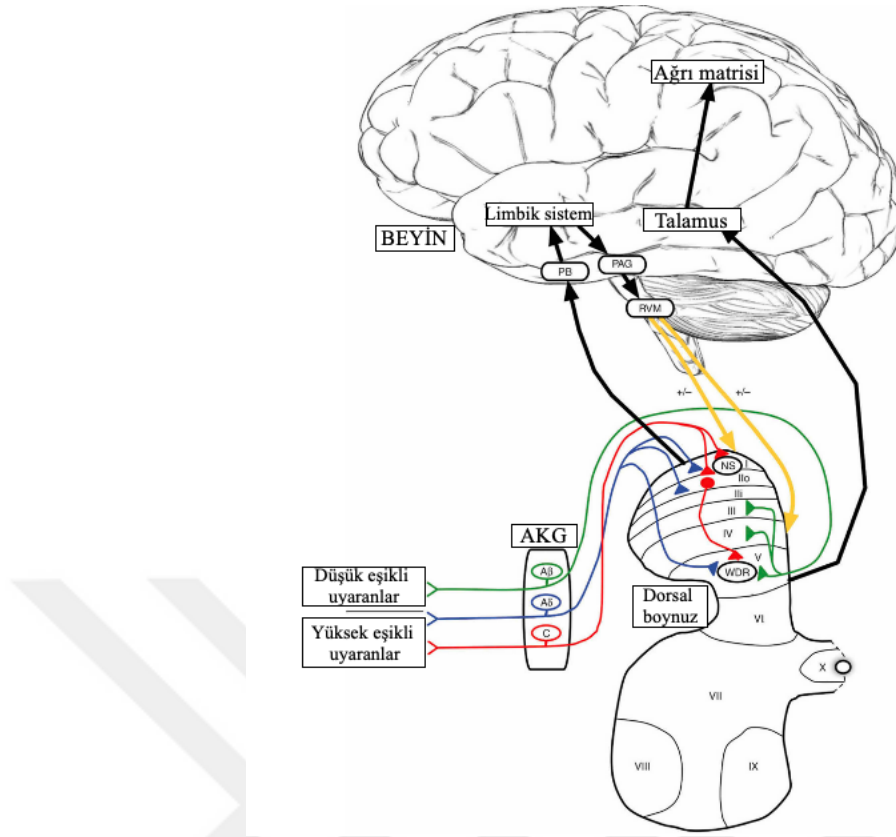
Memelilerde iç organlardan gelen ağrılı uyarıların AKG'de hücre gövdeleri olan spinal afferent nöronlar tarafından tespit edildiğine dair kanıtlar vardır (3). AKG'de bulunan psödonipolar olan birincil afferent nöronlar, omuriliğe hem ağrı ilişkili olmayan hem de ağrılı uyarıların (mekanik, termal ve kimyasal) ileten nöronlarıdır. AKG nöronları proprioseptör, düşük eşikli mekanoreseptörler, sıcaklık reseptörleri, nosiseptörler, ve pruriseptörler olarak beş grupta sınıflandırılmaktadır. Farede 30 çift olan AKG'lar arka intervertebral boşluklarda bulunmaktadır. Bunların 8'i servikal (C), 13'ü toraks (T), 5 veya 6'sı lumbal (L) ve 4'ü sakralda olmak

üzere konumlanmışlardır. Farklı seviyelerde bulunan AKG nöronları, iç organlarda veya diğer dokularda, çoğu durumda nosiseptörler olarak adlandırılan serbest sinir uçları, ağırlı uyaranları iletme ve kodlama yeteneğine sahip yüksek eşikli bir duyuasal reseptör olarak sonlanan aksonları gönderirler. Hedef dokudan veya organdan duyuasal veriyi alan farklı tipteki AKG nöronları özelleşmiş olarak omurilikteki 5 laminadan birine giriş yaparak beyne ulaşmaktadırlar (44). Bu durum seçicilik olarak adlandırılmaktadır. Bu hipoteze göre her bir duyu kendisine özelleşmiş duyuasal ağı veya işaretlenmiş yol ile periferden beyne iletilmektedir. Hedef dokudan alınan her ileti tipi özelleşmiş bir yol ile beyne iletilmektedir. Termoseptif, nosiseptif, mekanik ve propriyoseptif uyaranları ileten çevresel yollar oldukça ayrılmıştır. Nosiseptif, termoseptif ve pruritoseptif uyaranları ileten miyelinsiz C-nosiseptörler ve hafif miyelinli A $\delta$  afferentleri dorsal boynuzun lamina I/II'sine projeksiyonları vardır, propriyoseptif bilgi taşıyan geniş çaplı hızlı ileten nöronlar ise orta ve ventral tarafta bulunan omurilikteki nöronları inerve eder. Bu bağlamda son yapılan çalışmalar iletilen benzer tipte duyu bilgisinin hassaslığı doğrultusunda farklı şekillerde taşındığını göstermektedir (44). Dorsal omurilikte hafif dokunuşu algılamada önemli bir role sahip olan belirli bir nöron sınıfı ablasyon ile baskılandığında farelerin hafif dokunuşa gösterdiği davranışsal tepkilerin önemli ölçüde azaldığı, ancak zararlı veya kaşıntılı uyaranlara tepki vermeye devam ettikleri gösterilmiştir (44).

#### **4.4.2. Duyusal verilerin periferik sinir sistemi ile aktarım mekanizması**

Duyusal deneyim, birincil afferent liflerin periferik terminallerinin sayısız uyarana yanıt verdiği ve bu bilgiyi, bu liflerin merkezi uçlarının sona erdiği omuriliğin dorsal boynuzuna çevirdiği periferde başlar. Periferik sinir sisteminde A $\beta$  lifleri, A $\delta$  lifleri ve C lifleri olmak üzere üç ana duyuasal lif türü vardır (Şekil 4.3). Her birinin, farklı türde duyuasal bilgilere yanıt vermelerine ve iletmelerine izin veren farklı özellikleri vardır. A $\beta$ -liflerinin çapları geniştir ve yüksek oranda miyelinlidir, bu nedenle aksiyon potansiyellerini periferden merkezi terminallerine hızla iletmelerine olanak tanır. Bu liflerin aktivasyon eşikleri düşüktür ve hafif dokunuşa dahi tepki vererek dokunsal bilgilerin iletilmesinden sorumludurlar. A $\delta$  liflerinin çapı daha küçüktür ve ince miyelinlidir, bu da A $\delta$  liflerini Ab liflerinden daha yavaş ileten özellikte yapar. Ayrıca bu lifler daha yüksek aktivasyon eşiklerine sahiptir. Hem

termal hem de mekanik uyarılara yanıt verirler. C lifleri, birincil afferentlerin nedenle en yavaş iletkenliğe sahip, miyelinsiz en küçük türüdür. Aktivasyonun başlaması için çok yüksek eşiklere sahiptirler ve bu nedenle seçici olarak nosiseptif veya 'acı verici' uyarıları tespit ederler. Bütünsel olarak ele alındığında, hem A $\delta$ - hem de C lifleri, mekanik, termal veya kimyasal olabilen zararlı uyarılara yanıt veren nosiseptörler veya 'ağrı lifleri' olarak adlandırılabilir. Birincil afferent lifler (A $\beta$ -, A $\delta$ - ve C-lifleri) impulsları periferden AKG yoluyla omuriliğin dorsal boynuzuna iletir. Nosiseptif spesifik (NS) hücreler esas olarak yüzeysel dorsal boynuzda (lamina I-II) bulunurken, çoğu geniş dinamik aralığa sahip hücreler (wide dynamic ranges ,WDR) daha derinde (lamina V) bulunur. Lamina I'den gelen projeksiyon nöronları, parabrakiyal alan (parabrachial area, PB) ve periakvaduktal gri (periaqueductal grey, PAG) gibi alanları inerve eder ve bu tür yollar limbik alanlardan etkilenir. Buradan, rostral ventromedial medulla (rostral ventromedial medulla, RVM) gibi beyin sapı çekirdeklerinden inen yollar (sarı oklar) aktive edilir ve spinal işlemeyi modüle eder. Lamina V nöronları esas olarak talamusa (spinothalamik yol) projeksiyonu vardır ve buradan "ağrı matrisini" oluşturan çeşitli kortikal bölgeler (birincil ve ikincil somatosensoryel, insular, anterior singulat ve prefrontal korteksler) aktive edilir (1) (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3** Periferden beyne giden ağrı yolları. Nosiseptif spesifik (NS), geniş dinamik aralık (wide dynamic ranges ,WDR), rostral ventromedial medulla (rostral ventromedial medulla, RVM), parabrakiyal alan (parabrachial area, PB) ve periakuaduktal gri (periaqueductal grey, PAG) (1).

#### 4.5. Organ özelinde spinal afferent çalışmaları

Özellikle iç organlara ait afferent sinirlerin çalışılması vagal sinir üzerinde yoğunlaşmış olsa da AKG kökenli afferentler üzerinde de çalışmalar giderek artmaktadır. Primer duyu nöronlarının genetik olarak alt gruplarının tanımlanması, organ inervasyonlarının gösterilmesi ve fonksiyonlarının tanımlanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Özellikle işaretlemeye yaygın olarak geçmişte gümüş işaretleme, horseradish peroxidase dye (HRP) gibi yöntemler kullanılırken günümüzde anterograde veya retrograde boyalar ve virüslerin spesifik enjeksiyonları afferentlerin takip edilebilirliğini sağlamaktadır. Duyu nöronlarının AKG gövdelerindeki alt gruplarının özellikle derideki sonlanmaları yoğun olarak çalışılmıştır (4,45,46). Mekanik uyarılara, ısıya, sıcaklığa, kaşıntıya, okşama tarzı

dokunmaya yanıt oluşturan AKG nöronları ayrıştırılmış ve detaylandırılmıştır. Özellikle bu alt tip nöronların moleküler olarak gen ekspresyonu özelindeki farklılıkları tanımlanmıştır. Örneğin,  $Mrgprd^+$  ve  $MrgprB4^+$  afferentlerin deri yüzeyinden aldıkları bilginin tipi ve yanıtını GCaMP virüsü enjekte edilmiş cre transgenik hatlarında çeşitli davranış deneyleri uygulayarak anlamaya çalışmışlardır (4,46–48).

Arterlerde basıncın düzenlenmesinin altında yatan mekanizmanın anlaşılması için vasküler tonusu düzenleyen spinal ganglionlarda bulunan hücre gövdeleri Chiara Morelli ve grubu tarafından gösterilmiştir.  $TrkC::ChR2$ -YFP ikili transgenik hattında yapılan lokal uyarım ile damar çapının ve kan akışının azaldığı, sistemik aktivasyon sempatik sinir sistemi yoluyla sistolik kan basıncı ve kalp hızı değişkenliğini arttırdığı gösterilmiştir (49). Nöronların kemogenetik inaktivasyonu veya ablasyonu, sistolik kan basıncında bir azalmaya, artan kalp hızı değişkenliğine ve nihayetinde 48 saat içinde ölüme yol açan lokal kan akışındaki değişkenliği başlatmaktadır. Bu nedenle,  $TrkC$ /Tirozin hidroksilaz pozitif duyu nöronları, otonom sinir sistemi yoluyla kardiyovasküler homeostazı koruyan duyuusal bir geri besleme mekanizmasının bir parçasını oluşturduğu savunulmaktadır (49).

Organ özelinde yapılan bir diğer çalışma ise kalbe enjekte edilen retrograd adeno-ilişkili virüsün (rAAV2-retro), vagus siniri, NG ve beyin sapında bulunan afferent nöron gövdelerinde, opsin raportör ekspresyonu ( $ChR2$ ) gösterilmiştir (33). Vagal stimülasyonun kalp atım hızına olan etkileri elektrokardiyogram ile alınan ölçümlerle gösterilmiştir. Benzer şekilde bu uyarıya solunum hızındaki değişkenler de incelenebilmektedir. Özellikle sadece solunumu etkileyip kalbi etkilemeyen ya da tam tersi durumu inceleyen çalışmalar için çalışılan organdan spesifik olarak retrograd virüs enjeksiyonu ya da tam tersi organa özgü proteini aktive edecek virüs enjeksiyonunun NG üzerinden yapılarak hedef organlar üzerinde görüntüleme ve fonksiyon analizleri yapılabilmektedir (33).

#### **4.7. Kardiyovasküler Sistem**

Kalp, gebeliğin üçüncü haftasının sonlarında atmaya başlar ve ölüme kadar aralıksız olarak devam eder. Aralıksız çalışması ve kan pompalama görevi nedeni ile



oksijen ve besin maddeleri ihtiyacı yüksek olan kalbin etkili bir damar sistemine veya kan kaynağına sahip olması önemlidir. Bu nedenle kalbi besleyen arterler önem arz etmektedir. Kalbe arteriyel kan sağ ve sol koroner arterler tarafından sağlanır (50). Sol koroner arter sol ön inen arter ve sol sirkumfleks arter (circumflex artery veya kısaca Cx) olarak ikiye ayrılır. Kalp gevşeme (diyastol) ve kasılmış durum (sistol) arasında gidip geldiği için, miyokardiyumdan kan akışı yalnızca diyastol sırasında gerçekleşebilmektedir (51). Pulmoner ve sistemik dolaşım yoluyla yeterli kan akışını sağlamak için miyokardın kasılması koordine edilmelidir (51). Bu da, intrinsik ve ekstrinsik elektrik mekanizmalarıyla sağlanır.

#### **4.7.1 Kalp Kasının Kasılma Mekanizması**

Kalp kası üç doku katmanından oluşur: perikard, miyokard ve endokard. Perikard veya perikardiyal kese, kalbi çevreleyen çift katmanlı, kalbi mediastinal boşluğa diyaframın alt kısmından sabitleyerek aşırı gerilmesini önleyen kapalı bir kesedir (50). Miyokard, vücuda kan pompalamaktan sorumlu kalp kasından oluşan güçlü, kalbin orta tabakasıdır. Kalp kası hücreleri, uçtan uca bağlı olmanın yanı sıra, bitişik hücrelere interkalar diskler olarak bilinen temas noktalarında bağlanır ve hücreler arasındaki temas alanını artırır. Her interkalar disk aksiyon potansiyellerinin hücreler arasında kolayca geçmesine izin veren düşük elektrik direncine sahip birçok boşluk bağlantısı (gap junction) bulunmaktadır (50). Kalp kası hücrelerinin bu dizilimi sayesinde sinsityum (birleşmiş hücreler) olarak bilinen ve kalp kası hücrelerinin tek bir birim olarak hareket etmesini sağlayan kulakçıkların ve karıncıkların koordineli kasılması gerçekleşir. Endokard ise kalbin en iç tabakasıdır. Kalbi ve kan damarlarını kaplayan epitel hücrelerinden oluşur. Bu pürüzsüz iç astar, kardiyovasküler sistem boyunca kan akışına yardımcı olur. Endotel kıvrımları, kalpten kan akışını kontrol eden valfleri oluşturur (50).

Kalbin atımını sağlayan kasılma sinyali kalbin sağ üst atriyumunda bulunan özelleşmiş sinir lifleri olan ve doğal kalp pili olarak da bilinen sinatrial düğüm (SA) tarafından başlatılmaktadır (52). Sağlıklı bir kalpte SA düğümü doğal bir pildir (pacemaker) ve kasılmaya sebep olan elektriksel impulsları kontrol eder. SA düğüm kalp ritmini, iletim hızını, miyokardiyal kasılmayı ve rahatlamaı kontrol eden parasempatik ve sempatik sinirler ile donatılmıştır (6,53). Kalbe sinyal getiren ve

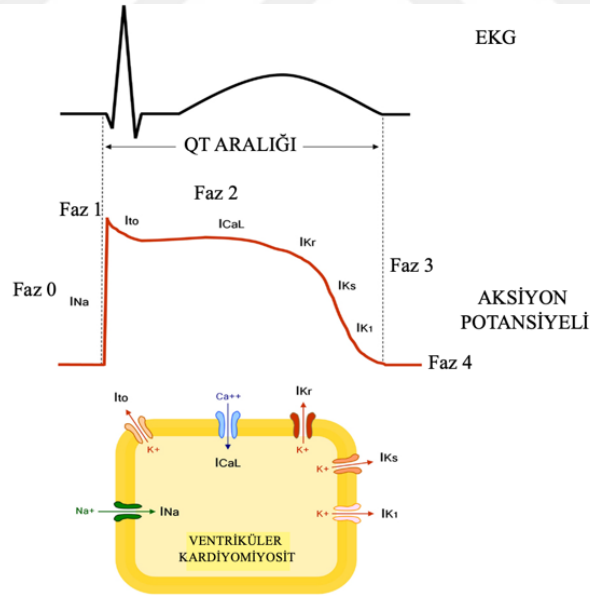
kalpten sinyali götüren sinir yolları çeşitli hayvan modellerinde ve insanda tanımlanmıştır. Bunlardan sempatik ve parasempatik sinirler otonom sinir sisteminin bir parçası olup ve merkezi sinir sisteminden kardiyak dokuya uyarı getiren nöronlardır (6,7,53). Kardiyak otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik dalları, esas olarak pacemaker dokusu üzerindeki etkileri yoluyla kalp atış hızını ve iletim hızını modüle etmek için karşılıklı bir şekilde çalışırlar (54). Kalp hızı kontrolü için, pacemaker bölgelerinde postganglionik kardiyak parasempatik ve sempatik aksonların fiziksel yakınlığı, norepinefrin salınımının asetilkolin inhibisyonu yoluyla akso-aksonal sinapsların oluşumuna ve fonksiyonun karşılıklı modülasyonuna veya tam tersi baskılanmasına izin verir (54). Buna ek olarak, sempatik sinirler atriyal ve ventriküler kardiyomiyositleri inerve ederek kasılma ve gevşeme kuvvetini etkilemektedir (55,56). Duyu nöronları ise beyne kalpte oluşan duyu bilgisini (acı, basınç ve gerilme) taşıyan 'geri götürücü' nöronlardır (1). Kalpten duyu bilgisini taşıyan nöronlar AKG veya NG'ye yönelirler. Afferentlerin taşıdığı duyuusal bilginin moleküler ve fonksiyonel karakterizasyonu net olarak bilinmemektedir.

#### **4.7.2 Kardiyak aksiyon potansiyeli**

Kardiyomiyositler uyarılabilir hücrelerdir ve bir uyarıya yanıt olarak, kasılma yanıtıyla ilişkili bir AP oluşturabilirler. Bir AP, iyonların membrandan çift taraflı difüzyonu ile üretilen birkaç iyon akımının elektrokimyasal değişiklik oluşturduğu membran potansiyelinde tersinir bir değişikliğin sonucunda oluşur. Atriyal ve ventriküler kas hücrelerinin ve His-Purkinje sisteminden gelen hücrelerin dinlenme membran potansiyeli  $\sim -85$  mV'dir. Membran potansiyeli eşik potansiyelini ( $\sim -65$  mV) aştığında bir depolarize edici uyarının ardından bir AP üretilir. Böylece, hücrel depolarizasyon sırasında dinlenme membran potansiyeli negatif değerlerden ( $-85$  mV) pozitif değerlere ( $+20$  veya  $+30$  mV'a kadar) hareket eder ve daha sonra repolarizasyon işlemi sırasında bazal dinlenme membran potansiyeline geri döner (Şekil 4.4). Kardiyak aksiyon potansiyelinin oluşumunda yer alan iyonik akımlar Şekil 4.7.1'de ve normal aksiyon potansiyelinin 5 aşaması gösterilmektedir: Faz 4 veya dinlenme potansiyeli, normal çalışan miyokardiyal hücrelerde  $\approx -85$  mV'de stabildir. Faz 0, hızlı depolarizasyon fazıdır. Membran potansiyeli pozitif voltaj aralığına kayar. Bu aşama, kardiyak uyarının hızlı yayılmasının merkezinde yer alır (iletim hızı,  $\theta=1$  m/s). Faz 1,

hızlı repolarizasyon aşamasıdır. Bu aşama, aksiyon potansiyelinin bir sonraki aşamasının potansiyelini belirler. Faz 2, hücreye kalsiyum giriş aşamasını gösteren uzun süreli bir plato evresidir. Faz 3 ise, membran potansiyelinin dinlenme değerine geri döndüğü hızlı repolarizasyon fazıdır (57).

Kalbin elektriksel aktivitesinin ölçülmesi için elektrokardiyografi (EKG) sistemi kullanılır ve sonucunda çıkan veriye elektrokardiyogram denir. Elektrotlar doğru bir okuma elde etmek için düzgün bir şekilde yerleştirilmelidirler. Okuma, tek bir hücrenin aksiyon potansiyelinden ziyade tüm kalp kasının elektriksel aktivitelerin bir bileşimidir. EKG’de P dalgası, SA düğümünden AV düğümüne gelen depolarizasyon dalgalarının sonucudur. Kulakçıklar P dalgası başladıktan 0.1s sonra kasılır. QRS kompleks ventriküler depolarizasyonun sonucudur P dalgasından 0,15 s sonra görülür ve ardından ventriküler kasılma oluşur. Ventriküler repolarizasyon sonucu T dalgası oluşur (57).



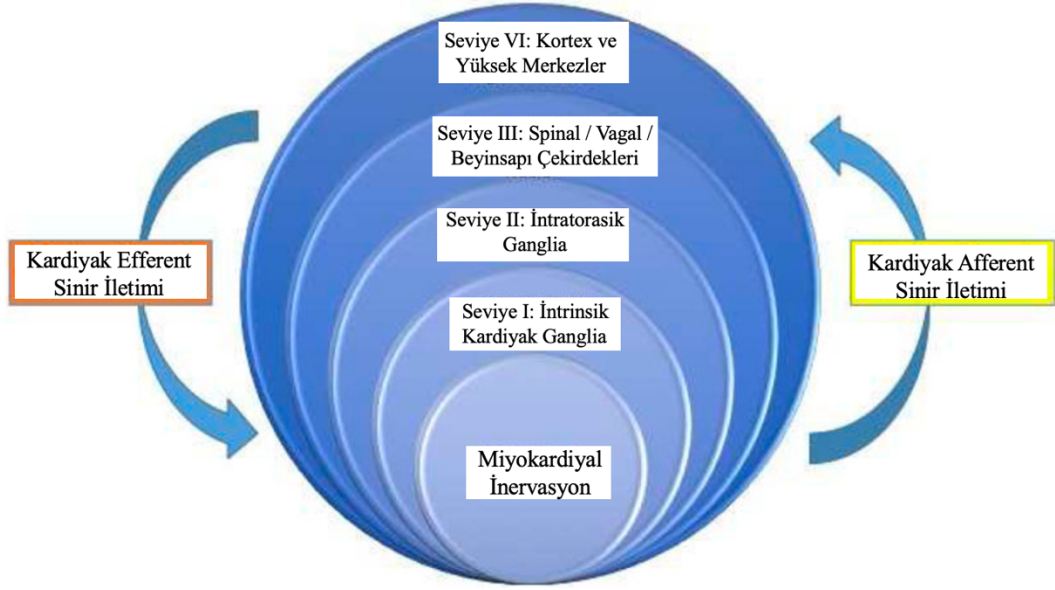
**Şekil 4.4** QT aralığının moleküler ve elektrofizyolojik temeli.  $I_{Na}$ , sodyum akımı;  $I_{to}$ , geçici dış akım;  $I_{CaL}$ , L-tipi kalsiyum akımı;  $I_{Kr}$ , gecikmeli doğrultucu potasyum akımının hızlı bileşeni;  $I_{Ks}$ , gecikmeli doğrultucu potasyum akımının yavaş bileşeni;  $I_{K1}$ , içe doğrultucu potasyum akımı (58).

#### 4.8. Kalp ve sinir sistemi ilişkisi

Kalp, duyuşal, sempatik ve parasempatik liflerle yoğun bir şekilde inerve edilir. Kalpten gelen duyuşal girdinin efferent ağına entegrasyonu ve etkileşimi yoluyla kardiyak fonksiyonun dzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Pompalama işlevi için inervasyon gerekli olmasa da, kalp dışı (estrakardiyak) ve kalp içinde bulunan (intrakardiyak) sinir dęümlerindeki (gangliyon) geniş bir efferent ve afferent sinir lifleri ağı, kalp dokusunda kasılma ve uyarı iletiminin kontrolüne katkıda bulunur (şekil 4.5) (59). Kardiyak nöral inervasyon birden fazla seviyede geręekleřir ve her seviye, afferent sinir iletimi ile alma ve kalbe giden efferent sinir yolu ile doğrudan veya dolaylı olarak kontrol etme yeteneğine sahiptir (şekil 4.5). Seviye I, epikardiyumun yağ dokusunda bulunan intrinsik kardiyak gangliyonları (IKG, epikardiyal gangliyonlar : EpKG) temsil eder. Seviye II stellat, orta servikal ve torasik gangliyonları içerir. Seviye III, spinal afferentler, vagal sinir ve beyin sapı çekirdeklerini içerir. Seviye IV, korteks ve daha yüksek merkezleri temsil eder. Her seviye aynı zamanda sinirsel bilginin paralel işlenmesini de gösterir (şekil 4.5), (60). Kalbin parasempatik kontrolü, beyin sapı içindeki vagusun ambeguus çekirdeğinden ve dorsal motor çekirdeğinden kaynaklanır. Kalbin sempatik kontrolü rostral ventromedial medulla, rostral ventrolateral medulla, ponsun A5 alanı ve hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinden köken alır (61).

Nöral krestte ortak bir kökene sahip olan otonom kardiyak nöronlar işlevsel fenotiplerine doğru olgunlařtıķça belirgin şekilde gelişimsel farklılaşmaya uğrarlar. Progenitör hücreler, göç ve yönelim sırasında nörokimya ve farklılaşmalarını destekleyen parakrin kaynaklardan aldıkları sinyallere yanıt verirler. Otonomik aksonlar bu yönelim ve farklılaşma doğrultusunda kalp dokusunu inerve etmeye başladığında, vasküler dokudan gelen nörotrofik faktörler, nöronların hedeflerine ulaşmadan önce doku üzerinde etkin olabilmesi için gerekli olmakla birlikte nihai olgunlaşmayı, sinaptik bağlantıyı ve sağ kalımı sağlayan nörotrofik faktörler kalpten salınır. Hedeften türetilen nörotrofinlerin gelişimde merkezi bir rolü olmasına rağmen, alternatif nörotrofin kaynakları da inervasyonu modüle edebilir. Özellikle nerve growth factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor ve neurotrophin 3 gibi faktörler bunlara örnektir.

### Kardiyak İnervasyonun Seviyeleri



Şekil 4.5 Kardiyak nöral kontrolün şematik görüntüsü (60).

#### 4.8.1. Kardiyak otonom sinir sistemi

Kardiyak inervasyonun genel anatomisi birkaç yıldır araştırma konusu olmuştur. Memelilerin ve insan kadvralarının diseksiyonları, türler arasında miyokardiyal inervasyonun önemli ölçüde korunduğunu göstermiştir. Kalbi inerve eden otonom sinir sistemi 3 bölüme ayrılmıştır: i) merkezi; ii) intratorasik ekstra kardiyak; ve iii) intrinsik kardiyak bileşenler. İntratorasik ekstrinsik kalp sinir sistemi, kalp içindeki intrinsik kalp sinir sistemini merkezi sinir sistemine bağlar (62). Kardiyak elektriksel ve mekanik göstergeler üzerinde zıt etkiler gösteren parasempatik ve sempatik motor bileşenlerinden oluşur. Kardiyak otonom sinir sistemi beyinden gelen sempatik ve parasempatik sinirler dışında kendine ait ve birbirleriyle iletişim halinde bulunan IKG ve ekstrakardiyak intratorasik ganglia merkezlerine sahiptir (24). Kardiyak otonom sinirleri, kalbe özgü kardiyak pleksuslar, gangliyonlar ve pacemaker gibi özelleşmiş bölgeleri ile etkileşim halindedirler ve bu nedenle bu özelleşmiş bölgeler özellikle komşu sinirlerden nörotransmitter, nöropeptidler ve trofik faktörlerin salınmasına duyarlıdır.

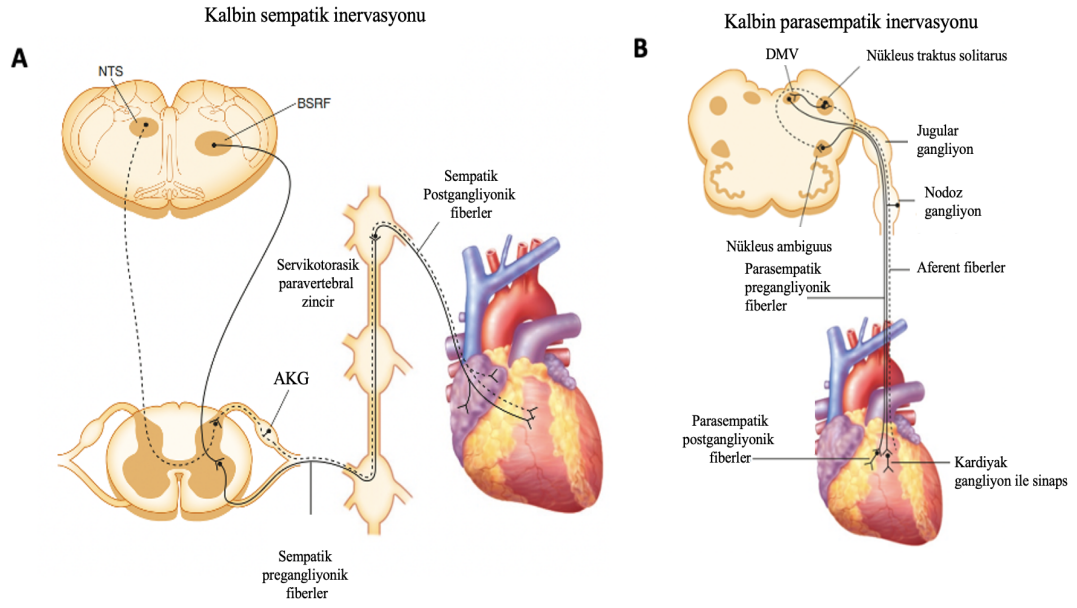
#### **4.8.1.1. Sempatik motor nöronlar**

Sempatik efferent preganglionik nöronlar omuriliğin intermediolateral hücre kolonundan kaynaklanır ve C7-T6 segmentlerinde yer alan superior servikal, orta servikal, servikotorasik (stellat) gangliyonlar (sempatik zincir) ve mediastinal gangliyonlardaki postganglionik sempatik nöronlara projeksiyonu vardır. Paravertebral stellat (alt-orta servikal) ganglion (SG) olarak da bilinen postganglionik kardiyak sempatik nöronların hücre gövdelerinin kalpten gelen retrograd olarak işaretlenmesi ile sempatik sinirlerin çoğunun kökeni olarak gösterilmiştir (63). Bu postganglionik nöronlar, aksonları çoklu kardiyopulmoner sinirler aracılığıyla atriyal ve ventriküler miyokardiyuma ve sınırlı intrinsik kardiyak adrenerjik nöron popülasyonlarına yansıtır. Kawashima, insan kadavralarında yaptığı histolojik çalışmalarda otonom sinirlerin kökenini ve seyrini mikroskopi kullanarak analiz eden ve türler arasında üst ve orta servikal, mediastinal ve stellat gangliyonların korunmuş doğasını vurgulayan ayrıntılı bir çalışma yayınladı (62). Lokal intrinsik kardiyak sinir sistemi duyu nöron aktivasyonu postganglionik parasempatik nöronları aktive ederken, sempatik afferentler stellat gangliyonlar ve omurilikten girerler ve soliter trakt çekirdeğinde sonlanırlar (64–66). Bu sistemde sempatik motor nöron çekirdeklerini içeren gangliyonlar kalbin dışarısında ve vücudun toraks bölgesinde buldukları için intratorasik ekstrakardiyak gangliyon olarak isimlendirilmektedir. Servikotorasik paravertebral zincir içerisinde bulunan bu sempatik gangliyonlardan çıkan fiberler kalbin sağ atriyumuna uzanırlar (Şekil 4.6 A). Kalbi inerve eden AKG kökenli duyu nöronlarının aksonları ile kalbe giden sempatik lifler omurilik kordonu içerisinde birbirlerine yaklaşırlar. MSS'nin sempatik efferentleri aksonlarını intratorasik ekstrakardiyak gangliyonlara uzatırken, MSS'nin parasempatik efferentleri aksonlarını epikardiyal yağ dokusunda lokalize olan intrakardiyak gangliyonlara uzatır (Şekil 4.6) (28,61,67). Kalbin sempatik inervasyonu öncelikle stellat gangliyonların postganglionik sinirleri tarafından sağlanır (28).

#### **4.8.1.2. Parasempatik motor nöronlar**

Parasempatik sinir sisteminin preganglionik nöronları, medulla oblongata'nın ambiguus nükleus, dorsal motor nükleusu ve bu iki yapı arasındaki bölgelerde yer alır. Vagus siniri ve onun çoklu intratorasik kardiyopulmoner dalları aracılığıyla efferent

postgangliyonik parasempatik nöronların çok sayıda IKG'a projeksiyonları vardır (68). Kardiyak gangliyonlarda bulunan postgangliyonik efferent parasempatik nöronlar, hem sağ hem de sol vagal gövdelerden pregangliyonik girdiler alırlar (69). Bununla birlikte, kalbin parasempatik inervasyonu, epikardiyal yağ yastıklarında bulunan kolinerjik IKG'lara yansıyan Dorsal motor vagus çekirdeği (DMV) ve nukleus ambiguus (NA) nöronları tarafından sağlanır (28,61,70). DMV'den kalp epikardiyumuna veya miyokardiyuma doğrudan inervasyonu gösteren herhangi bir yayın raporlanmamıştır. DMV ve NA nöronları doğrudan kalbe yansıtmaz, kalbin supraventriküler bölgelerinde yer alan kardiyak gangliyonlarla sinaptik bağlantılar kurar (Şekil 4.6 B) (61,67). Çoğunlukla NA'da bulunan ve DMV'de çok az sayıda bulunan nöronların kalpteki parasempatik gangliyonlarla sinaps yaptığı gösterilmiştir (71,72). Köpeklerdeki anatomik diseksiyonlar, postgangliyonik vagal nöronların sağ pulmoner ven-atriyal birleşim alanında gangliyon pleksusun içerisinde bulunan sinoatriyal (SA) düğümüne gittiği gösterilmiştir. Ayrıca AV düğümü etkileyen postgangliyonik vagal nöronlar çoğunlukla inferior vena kava-inferior sol atriyum kavşağının bitişiğindeki bölgede gösterilmiştir (73). Medulla'dan köken alan Vagus sinirinin parasempatik lifleri jugular ve nodoz gangliyon içerisinden geçerek kardiyak gangliyonlar ile sinaptik bağlantı kurarlar (Şekil 4.6 B). Şekilde gösterildiği gibi Medulla'dan çıkıp kalbe giden parasempatik lifler, kalpten çıkan vagal duyuların hücre gövdelerinin bulunduğu NG'den geçerek kalbe ulaşırlar. Literatüre dayanarak, merkezi sinir sistemindeki kalbi inerve eden tüm efferent nöronlar kardiyak gangliyonlara projekte olmaktadır. (61,70). Böylece, beyin sapında lokalize olan otonom çekirdeklerden kalbe direkt inervasyon yoktur.



**Şekil 4.6** Kalp-sinir sistemi etkileşimi A. Kalbin sempatik inervasyonu ve kalpten gelen AKG nöronları ile omurilik kordonu içerisindeki yollar. B. Medulla'dan kalbe inen parasempatik lifler ve kalpten çıkan vagal nöronların NG'deki fiziksel konumlarının gösterim.

#### 4.8.2. Kalbi inerve eden afferent lifler

Afferent sinirler vagal gövde ve "sempatik" lifler içinde sırasıyla NG ve AKG'ye gider. Kalp, koroner ve pulmoner arterlerden gelen afferentler, çeşitli kardiyovasküler refleksleri tetikler. Kardiyak afferentler, sempatik sinir gövdelerinin yörüngesini takip eden torasik AKG'de hücre gövdeleri olan miyelinsiz afferentleri dorsal boynuza (özellikle lamina I) ve omuriliğin orta gri maddesine akson gönderir. NG'de ise NTS'ye girdi sağlayan hücre gövdeli miyelinli ve miyelinsiz vagal afferentlere girdiler sağlar. Ventrikülleri inerve eden miyelinsiz spinal ve vagal afferentler, iskemi veya adozin trifosfat, serotonin ve prostanoidler gibi inflamasyon ürünleri dahil olmak üzere güçlü mekanik veya kimyasal uyarılarla aktive edilirler (74). İçsel kardiyak sinir sistemi, ekstrakardiyak intratorasik gangliyonlar, omurilik, beyin sapı ve daha yüksek merkezler dahil olmak üzere birden fazla düzeyde afferent bilginin işlenmesi, efferent kardiyomotor (sempatik ve parasempatik) sinyalleri normal ritim ve dolaşımı sürdürmek için modüle eden etkileşimli geribildirim döngüleri mekanizması sağlar. Afferent sinir lifleri, miyokarddan kritik geri bildirim sağlar ve mekanosensör,



kemosensör olarak görev alabilirler. Kemosensör nöronlar, hidrojen iyonları, potasyum, bradikinin, oksijen radikalleri, adenosin, adenosin trifosfat ve araşidonik asit (arachidonic acid) metabolitleri dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt verir. Bu sinir lifleri, IKG'lara, intratorasik gangliyonlara, omuriliğin AKG ve NG (vagosempatik gövdenin alt gangliyonları) yoluyla beyin sapına bilgi gönderir. Topografik pozisyon ve farklı duyuları algılamak üzere özelleşmiş AKG nöronlarının varlığı duyuşal verinin yeri ve tipinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Benzer şekilde, farklı reseptörlere sahip NG'da bulunan duyu nöronlarının ayrı organlardan duyuşal veriyi iletmekle sorumlu oldukları raporlanmıştır (75). AKG ve NG nöronları ile taşınan duyuşal veri, geri bildirim ile kalbin intrinsik veya beyinde sonlanan otonom sinirlerinin oluşturduğu motor komutun düzenlenmesinden ve kalbin fonksiyonel dengesinin sağlanmasından sorumludur (76). Ancak, özellikle AKG duyuşal nöronlarının taşıdıkları duyuşal bilginin moleküler ve fonksiyonel niteliği net olarak bilinmemektedir. Literatürde kalbin merkezi sinir sistemi ile olan ilişkisinin gösterildiği kaynaklarda, kalp-sinir sistemi ilişkisinin hiyerarşisinin karmaşıklığı gösterilmiştir (76).

#### ***4.8.2.1. Kalbi inerve eden spinal afferentler***

Dorsal kök (spinal) gangliyonlar, birincil duyu nöronlarının çeşitli alt popülasyonlarını içerir. Bunlar, ventral omurilikteki motor nöronlara yansıyan kas afferent duyu nöronlarını ve dorsal omuriliğe yansıyan kutanöz afferent duyu nöronlarını içerir. Kutanöz afferent duyu nöronlarının alt sınıfı içinde, düşük eşikli mekanoseptörler ve yüksek eşikli nosiseptörler olarak daha fazla çeşitlenme vardır. Bu ikinci kategori, akut ağrıya neden olan çeşitli zararlı termal, mekanik veya kimyasal uyarılara yanıt veren nöronları içerir (77). Ek olarak, bu tür nosiseptif nöronlar, inflamatuvar yanıtlar veya sinir hasarı ("nöropatik" ağrı olarak adlandırılır) ile bağlantılı kronik ağrıya aracılık eder. Kardiyak viseral afferent duyuşal liflerinin omurilikte sonlanan ve çoğunlukla epikardiyumda dallanmış olarak yaygın veya kompakt kapsüllenmemiş terminalleri bulunmaktadır. Anatomik çalışmalar, spinal kardiyak afferent liflerin öncelikle sol ventrikül kasının ön kısmını (ventral) inerve ettiğini göstermiştir (78). Özellikle retrograd ilerleyen boyalar veya HRP ile yapılan işaretlemelerle kalp ve koroner arterleri inerve eden kardiyak viseral spinal afferent

liflerin hücre gövdeleri AKG'lerin çoğunlukla T2-T6 spinal segmentlerinde yer alırken ve farklı çalışmalarda C8-T9 segmentleri arasındaki geniş bir alanda bulunabileceği gösterilmiştir (12,79,80). Hem kemosensitif nosiseptörler hem de mekanoreseptörler epikardiyumu inerve eden çoğunlukla polimodal afferent liflerin uyarılması ağrıya neden olur, koruyucu refleksi harekete geçirir ve kalp fonksiyonunu düzenler (81). Mekanosensitif miyelinli A $\delta$ - ve miyelinli C-lifleri, kan basıncındaki artışların yanı sıra bradikinine karşı zayıf tepkileri de içeren düşük eşik uyarısına hızlı bir şekilde yanıt verdiği gösterilmiştir. Mekanosensitif uçlardan alınan kayıtlar, her kardiyak döngüde düzenli bir aksiyon potansiyeli deşarj modeli olduğunu ve alıcı alana uygulandığında ince bir probun veya kılların nazik hareketine güçlü ve ani bir yanıt olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, kemosensitif uçlar kardiyak modülasyon göstermez ve düzensiz ve seyrek olarak deşarj olur. İlginç bir şekilde, her iki tip lif de bradikinine yanıt verebilir; bununla birlikte, prostaglandinlerin, özellikle PGE1'in kalbe uygulanmasıyla yalnızca kemosensitif uçlara sahip lifler duyarlılık gösterir. Bu mekanoreseptörlerin tepkileri zararlı eşik altında olduğundan, mekanoreseptif sonlanmaların anjina pectoris ile ilgili olduğu düşünülmez. Buna karşılık, kemosensitif lifler, fizyolojik aralığın dışındaki uyarılara yanıt verdikleri ve psödoeffektif kardiyovasküler refleksi uyandırdıkları için nosiseptörler olarak kabul edilir. Bu nedenle, kemosensitif lifler genellikle mekanik stimülasyona yanıt vermezler, ancak miyokard iskemi sırasında algenik kimyasalların salınımına şiddetle yanıt verirler (82).

#### ***4.8.2.1.1 VGLUT2 transgenik fare soyu***

Vesiküler glutamat transporter-1 olarak adlandırılan ve beyin-spesifik Na<sup>+</sup>-bağımlı inorganik fosfat taşıyıcısı olarak bulunan VGLUT1 proteini sinaptik vezikül membranında glutamat transporterı olarak görev alır (83). Birkaç yıl sonrasında VGLUT1 ile yüksek homoloji gösteren VGLUT2'nin de keşfedilmesi ile glutamat reseptörlerinin rolleri araştırılmaya başlanmıştır (84). VGLUT'ların ağrı mekanizmalarındaki rolü (sıklıkla viseral olmayan ağrı ile ilgili olarak) hakkındaki mevcut bilgilerin çoğu, global (DRG'ler, omurilik, beyin sapı ve beyin) veya koşullu olarak KO (Knock-out) edilmiş transgenik farelerle (DRG nöronlarının spesifik alt popülasyonlarını hedefleyen) çalışılarak toplanmıştır. DRG nöronlarında

VGLUT2'nin bol miktarda ekspresyonu ve onun aktif olarak merkezi ve periferik aksonal taşınmada görev alması, sinir uçlarındaki etkileri için sinaptik veziküller tarafından glutamatın dahil edilmesinde ilgili bir rol olduğunu düşündürür. VGLUT1 ve VGLUT3 gibi diğer alt tipler, ifade edildikleri ve VGLUT2 ile benzer rolleri paylaştıkları belirli nöronal alt popülasyonlar için de doğru olabilir (85). Torasik segmentlerin bilateral NG nöronları ve C5-T8 segmentindeki AKG'lerin kalbi inerve eden nöral soma barındırdığı gösterildi (12,33,86–88). Vasküler yapılar, eklemler, gastrointestinal sistem, dalak ve kalp gibi kutanöz olmayan hedeflerdeki afferent sonlanan tipler ve moleküler özellikleri büyük ölçüde bilinmemektedir. AKG'lerin ve NG'nin birincil duyu nöronları çoğunlukla glutamaterjik bir yapıya sahiptir (85). Veziküler glutamat taşıyıcı tip 2 (VGLUT2), AKG'deki afferent alt tiplerde bol miktarda ifade edilir (85). VGLUT2-ires-Cre transgenik fareleri, uyarıcı glutamaterjik nöron hücre gövdelerinde Cre rekombinaz ekspresyonunu genetik olarak yönlendirmek için Vong ve ekibi tarafından tasarlandı (89). VGLUT2-ires-Cre farelerinin karakterizasyonu, NG ve AKG duyu nöronlarının >%99'unun, VGLUT2 ekspresyonu ile ilişkili Rosa26 lokusundan Cre'ye bağlı raportör genleri eksprese ettiğini gösterdi (13,89,90).

#### **4.8.2.1.1 *Mrgprd* transgenik fare soyu**

Mrgs adı verilen Mas1 ile ilişkili 50 GPCR protein ailesinin bir alt kümesi olan ve ağırlı uyarıyı algılayan duyu nöronların belirli alt popülasyonlarında ifade edilen Mrgprd proteini nosiseptif bilginin iletilmesinde görev almaktadır. 50 tane farklı ifade kalıbı olan Mrgprs ailenin moleküler çeşitliliği farklı nosiseptör fonksiyonunu ve/veya gelişimini düzenleyebildiği düşünülmektedir (77). Nosisepsiyonun işlenmesinde bölgesel farklılıkların altında yatan mekanizmaları aydınlatmak için, yeni oluşturulmuş bir Mrgprd<sup>CreERT2</sup> fare hattını kullanarak vücutta peptiderjik olmayan nosiseptörlerin farklı bölgelerde fonksiyonlarını belirlemek için kullanılmıştır (45). Fare pençe derisinin ve bacadaki tüylü, tüysüz dokunun Mrgprd<sup>+</sup> nosiseptörler tarafından inerve edildiği Mrgprd<sup>CreERT2</sup> Cre bağımlı tdTomato ifade eden transgenik fare ile tespit edilip bunların omurilikteki bölgelerinin farklı olduğu ve farklı morfolojilerle sonlandığı tespit edilmiştir. Fonksiyonel farklılık olup olmadığı ise MrgprdCreERT2; RosaChR2-EYFP ikili transgenik faresi oluşturularak

incelenmiştir. Bu bölgesel farklılık, hem omurilik dilimlerinden alınan kayıtlarla hem de davranış deneyleri tarafından Mrgprd<sup>+</sup> nosiseptörlerinin pençe nosiseptif devrelerinin dış uyaranlara duyarlılığındaki bölgesel bir artışla çok iyi korelasyon gösteren yeni bir somatotopik organizasyon gösterdiği ortaya konmuştur (45).

#### **4.8.2.1.2 Pvalb transgenik fare soyu**

Dr. Silvia Arber tarafından geliştirilen Pvalb-Cre knock-in fareler, endojen Pvalb ekspresyonunu bozmadan beyindeki internöronlar ve AKG'deki afferent duyu nöronları gibi parvalbümin eksprese eden nöronlarda Cre rekombinazı ifade eder. Bu fareler, nöronal gelişim, farklılaşma ve fizyolojinin incelenmesinde faydalı olabilir. Nöronlar dışında kas yapısında da önemli işlevsel fonksiyonlarının olduğu bildirilmiştir. Çizgili kastaki gevşeme hızı, kısmen miyoplazmadan Ca<sup>+2</sup>'nin uzaklaştırılma hızı tarafından yönetilir. Ca<sup>+2</sup> ATPaz SERCA yoluyla sarkoplazmik retikuluma Ca<sup>+2</sup>'nin geri alınması, hem iskelet hem de kalp kasında Ca<sup>+2</sup>'nin uzaklaştırılmasının ana yoludur. Hızlı kasılan iskelet kası, sitozolik Ca<sup>+2</sup> tamponu olan parvalbumin (Parv), hızlı gevşeme sağlamak için ek benzersiz bir mekanizma içerir. Parv, E-F hand Ca<sup>+2</sup> bağlayıcı proteinlerin süper ailesine ait olan, düşük moleküler ağırlıklı (11.000 kDa), suda yüksek oranda çözünebilen bir proteindir. Parv, Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup>'nin rekabet ettiği iki bağımsız metal bağlama bölgesine sahiptir (91).

#### **4.8.2.1.3 VGLUT3 transgenik fare soyu**

Hongkui Zeng tarafından Jaxlab'a bağışlanan Slc17a8-ires-Cre-D knockin fareler, endojen veziküler glutamat taşıyıcı 3 ekspresyonunu bozmadan Vglut3 eksprese eden hücelere yönelik Cre rekombinaz ekspresyonuna sahiptir (92). Bu fareler, glutamaterjik sinaptik vezikül trafiği ile ilgili fonksiyon kazanımı, kaybı ve/veya kader haritalaması üzerinde çalışmak için koşullu mutasyonlar oluşturmak için kullanılabilir.

VGLUT3, glutamaterjik nöronlarda görünmemesi bakımından VGLUT1 ve VGLUT2'den farklıdır, esas olarak kaudat-putamenlerin kolinerjik nöronlarının bir alt popülasyonunda ve rafe nükleuslarının serotonerjik nöronlarında bulunur. Her VGLUT izoformunun benzersiz dağılımları, bu taşıyıcılar tarafından modüle edilen

glutamaterjik taşıma ve iletim şekillerine göre özelleşmiş belirtiler gösterebilir (93). Farelerde, AKG'deki miyelinsiz düşük eşikli mekanoreseptörler (C-LTMR), bir veziküler glutamat taşıyıcısı olan VGLUT3'ün ifadesi ve tirozin hidroksilazın (TH) ifadesi ile işaretlenir (94,95). C-LTMR'lerin TH alt kümesi, kılların etrafında uzunlamasına mızrak şeklinde uçlar oluşturur (95). VGLUT3'ten yoksun farelerin, iltihaplanma, doku hasarı, kimyasallar (kapsaisin) ve sinir hasarının neden olduğu mekanik allodinide (zararsız mekanik uyarılarla uyarılan ağrı) belirgin eksiklikler gösterdiği ve davranışsal fenotiplere dayanarak, patolojik koşullar altında mekanik ağrıya aracılık etmesi için C-LTMR'lerin önemli olduğu düşünülmüştür (94). Mekanik ağrıların taşınma sisteminin tanımlanmasında VGLUT3-cre fareler özellikle deri ve kıl kökü sonlanmaları da gösterilmek üzere kullanılmıştır (96).

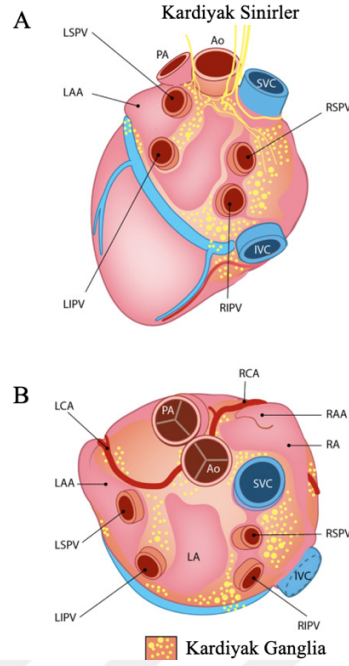
#### ***4.8.2.2. Kalbi inerve eden sinir sonlanma tipleri***

Kardiyak efferent inervasyonu geniş çapta çalışılmış olmasına rağmen, kalpteki ve diğer iç organlardaki afferent sonlanmaları ele alan çalışmalar sınırlı kalmıştır (10,17,19,97). Seçici retrograd boyalar ve modifiye AAV viral formları, spinal sinirler yoluyla AKG veya vagus siniri yoluyla NG'ye kardiyak afferent hücre gövdelerini izlemek için kullanılmaktadır (12,86,88). Kalpteki sinir uçlarının ve duyu reseptörlerinin sınıflandırma ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, çeşitli hayvan modellerinde ve insan dokusunda metilen mavisi ve gümüş emdirme yöntemleri kullanılmıştır (15). Morfolojik olarak, dallanma tipi uç ağları (branching type end-net meshes) veya çiçek benzeri sonlanmaları (flower spray endings) mekanoreseptörler ve baroreseptörler özellikle terminaller olabilecekleri ve aortik arkta (17,19), atriyumda (16) ve ventriküler endokardiyum (15) kısmi olarak yer aldıkları gösterilmiştir. Periferik organlarda spinal ve vagal afferent sinir uçlarını seçici olarak görselleştirmenin bir başka yolu, floresan haberciler ifade eden transgenik fare soyları oluşturmaktır (13,17,28). Çiçek benzeri sonlanmalar, dallanma tipi uç ağları, serbest tek akson dalları (single axon branches) ve ventriküllerdeki kalp kası lifleri ile hizalanan kas içi dizi sinir uçları (intramuscular array) gibi farklı şekillerde sonlanmalar kalbin farklı bölgelerinde gösterilmiştir.

### 4.8.3. İntrensik Kalp Gangliyonları - Epikardiyal Gangliyonlar

Memeli kardiyak gangliyonları (intrinsic cardiac ganglia), atriyal epikardiyum içinde epikardiyal yağ dokusu içerisine gömülü şekilde, ana kalp damarlarının duvarları boyunca kardiyak gangliyonlu pleksusun (ganglionated plexus) içinde farklı boyutlar ve ayrı yerlerde bulunmaktadır (Şekil 4.7) (86). Bazı memelilerde ayrıca ventriküler duvarı içinde de tespit edilmişlerdir (59). İntrensik gangliyonu içeren kardiyak pleksus, vagal efferent ve afferent nöronlar, ekstrinsik adrenerjik ve spinal duyu nöronları dahil olmak üzere birçok kaynak tarafından inerve edilmektedir. Uyarıcı sempatik ve engelleyici parasempatik girdiler arasındaki denge, kalp fonksiyonunun kontrolü için çok önemlidir. Kardiyak ganglion nöronlarından salınan birincil nörotransmitter asetilkolindir. Kolin asetiltransferaz (ChAT) ifade eden intrinsik kolinerjik nöronlar atriyal epikardiyal ganglionlarda bulunur (98). Postganglionik kolinerjik aksonlar tarafından salınan asetilkolin, G proteinine bağlı reseptörler aracılığıyla asetilkoline duyarlı potasyum akımını (IK,ACh) aktive ederek atriyal, sinuatriyal, AV düğümü ve His-Purkinje hücrelerinin membran potansiyelini doğrudan etkiler. Buna karşılık, aksonları kalbi inerve eden adrenerjik nöronlar, göğüs boşluğunda üst ve orta servikal, mediastinal ve stellat ganglionlarda bulunur (99). Yetişkin sıçanların, kobayların ve insanların intrinsik kardiyak nöronlarında tanımlanmış olan adrenerjik nöronlar, norepinefrin sentezi için gerekli olan tirozin hidroksilaz (TH) içerir (100).

İmmünokimyasal olarak farklı EpKG ve nöronların dağılımını inceleyen çalışmalarda, EpKG'ler şekil ve büyüklük bakımından farklılık gösterir ve çoğunlukla kalp hilusunun venöz kısmının sınırlarında, pulmoner ven köklerinin yakınında bulunduğu gösterilmiştir (67). EpKG'nin çoğu net sınırlara sahip olduğundan, ganglion sayısının değerlendirilmesi fare kalp preparatlarında gerçekleştirilmiş ve boyut olarak çok değişken olan 11 ile 30 EpKG olduğu tespit edilmiştir. En küçük EpKG sadece 3 nöronal soma içerebilirken, en büyük EpKG 700 nöronu kapsadığı gösterilmiş ve ganglion alanının ve nöronların sayısının doğrudan karşılıklı bağımlılığına dayanarak, faredeki toplam intrinsik kardiyak nöron sayısının  $1082 \pm 160$  olduğu tahmin edilmiştir (67,86).



**Şekil 4.7** Kardiyak ganglion pleksuslar. Kalbin yüzeyinde gangliyonlu pleksusların dağılımını gösteren, insan kalbinin postero-inferior (A) ve üstten görünümünün (B) çizimi. Ao, aort; IVC, alt vena kava; LA, sol atriyum; SAA, sol atriyal uzantı; LCA, sol koroner arter; LIPV, sol alt pulmoner ven; LSPV, sol superior pulmoner ven; Pa, pulmoner arter; RA, sağ atriyum; RAA, sağ atriyal uzantı; RCA, sağ koroner arter; RIPV, sağ alt pulmoner ven; RSPV, sağ üst pulmoner ven; SVC, üstün vena kava (86).

Gangliyonlar çoğunlukla CHAT ve TH için immünoreaktif olan sinir lifleri ile inerve edildiği gösterilmişken SP-IR ve CGRP-IR sinir lifleri de fare epikardiyumunda ve kalp hilumuna bitişik gangliyonlarda da görüntülendiler. SP-IR ve CGRP-IR sinir lifleri ince ve genellikle ChAT- ve TH-IR sinir lifleri ile birlikte karışık sinirler ve sinir demetleri içinde oldukları gösterildi (67). Sıklıkla, hem SP- hem de CGRP-IR sinir lifleri, değişen boyutlardaki kan damarlarının yakınında olduğu ve gangliyonların içinde SP- ve CGRP-IR sinir lifleri çok sayıda varikoslar içerip ve gangliyonik hücrelerle temas halinde olabilecekleri Rysevaite ve grubu tarafından gösterilmiştir (67). Öte yandan, birçok SP- ve CGRP-IR sinir lifi, herhangi bir özel sonlanma olmadan basitçe gangliyonlardan geçti. Miyokardiyal sinir ağı içinde, SP- ve CGRP-IR sinir lifleri, kolinerjik ve adrenerjik liflerden çok daha az olmalarına rağmen ortak miyokardiyal sinir demetleri içinde ortaklaşa ilerledikleri gösterilmiştir (67).

İntrinsik kardiyak sinir sistemi periferik otonom sinir sistemi ve kalp etkileşimlerinde görev alarak mevcut otonom sisteme ek olarak kalp homeostazında görev almaktadır. Sağ atriyal gangliyonlu pleksusun ablasyonu vagal bradikardiyi azaltırken sempatik fonksiyonun vagal inhibisyonunu koruduğu gösterilmiştir (73). Memeli kardiyak gangliyondaki nöronların çoğunluğu aksonlarını gangliyonun ötesine iletmeyen lokal devre oluşturduğu gösterilmiştir. Özellikle periferik otonomik etkileşimlere yönelik araştırmalarda kardiyak gangliyonlar hem sağlıklı hem de atrial fibrilasyona neden olan patofizyolojik durum veya miyokard infarktüs durumunda özellikle çalışılmaktadır (101).

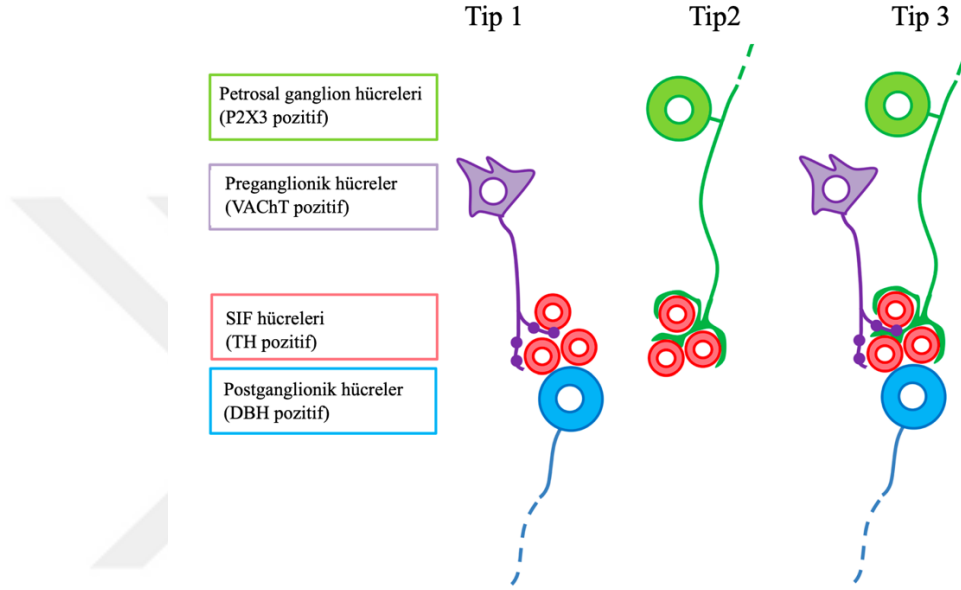
#### **4.8.4. Küçük yoğun floresan (SIF) hücreler**

Sempatik gangliyon, nöral krestten köken alan küçük yoğun floresan (SIF) hücreler ve TH için immünoreaktif olduğu gösterilen sempatik gangliyonik hücreler içerir (102,103). Elektron mikroskopisi, SIF hücrelerinin çok sayıda yoğun çekirdekli veziküller içerdiğini ve pregangliyonik sempatik sinir terminalleri ile afferent sinapslar ve postgangliyonik nöronların dendritleri ile efferent sinapslar yaptığını ortaya koymuştur (104). Fizyolojik çalışmalar, dopaminin sempatik gangliyon nöronları üzerindeki asetilkolin muskarinik reseptörlerini uyardığını göstermesine rağmen SIF hücrelerinin ayrıntılı inervasyon modeli bilinmemektedir (105,106).

İşlevleri henüz tanımlanmamış olmasına rağmen TH için immünoreaktif olan nöronlar bir çok farklı hayvan modelinde tespit edilmişlerdir (67,107). Yoğun floresan hücreler TH-IR sergilemekle birlikte gangliyon içerisinde veya pulmener ven üzerinde bulunan diğer TH-IR sinir hücrelerinden daha küçük boyutta oldukları gösterilmiştir (67). Bir çok yayında bu hücreler çok güçlü TH-IR sergileyen 3-8 hücrelik küçük kümeler halinde gruplanmış ve büyük gangliyonlar içinde veya ayrı ayrı atriyal ve ventriküler duvarlarda konumlanmış olarak gösterilmişlerdir (67,107). Genellikle, SIF hücreleri pulmoner venlerin köklerine yakın sol atriyumda ve sol koroner arterin gövdesinde daha sıktı. Nöronal somata (NS) ve küçük yoğun floresan (SIF) hücreler tavşan ventriküllerinde, konus arteriyozus ('subpulmoner infundibulum' olarak da bilinir) üzerindeki epikardiyumda ve pulmoner gövde kökünün ayrımında istisnai olarak intrinsik nöronlar tanımlanmıştır (107). SIF hücre grupları, pulmoner gövdenin kökündeki gangliyonların içinde veya yakınında tanımlandı.



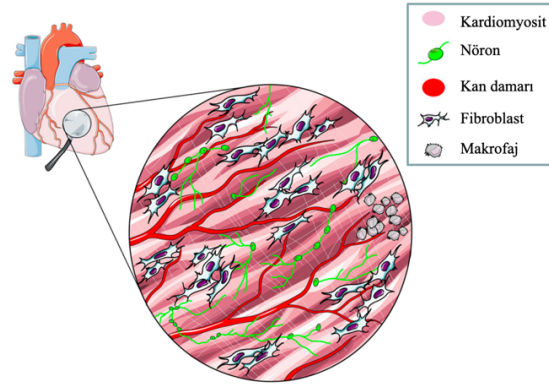
Takaki ve çalışma arkadaşlarının yaptıkları detaylı çalışmada superior servikal gangliyondaki SIF hücreleri, preganglionik lifler ve glossofaringeal duyuşal sinir uçları (glossopharyngeal sensory nerve endings) tarafından inerve edildiğini ve üç tipe sınıflandırılabilceğini göstermişlerdir (Şekil 4.8). Çalışmanın sonucuna göre, bu hücreler, internöron rolüne ek olarak duyuşal işlevlere de sahip olabilir ve sempatik sinirlerin işlevlerini düzenleyebilir (108).



**Şekil 4.8** İnvazyonlarına göre sınıflandırılan üç tip SIF hücresi. Yalnızca preganglionik terminalleri olan Tip 1 SIF hücreleri. Yalnızca glossofaringeal duyuşal sinir uçlarına sahip tip 2 SIF hücreleri. Hem duyuşal sinir uçları hem de preganglionik akson terminalleri olan Tip 3 SIF hücreleri şematize edilmiştir (108).

#### 4.8.5. Kalp kasında bulunan ve kalbin işleyişine katkıda bulunan diğer hücreler

Kalp homeostazı birçok çok hücreli "devrenin" aktivitesine dayandığından, her hücre tipinin lokalizasyon ve miyokardiyal etkileşimlere göre bireysel rolünün ince bir şekilde belirlenmesi için nörobiyoloji gibi optogenetik çalışmalardan yararlanmıştır. Miyokard, uyarılabilir (iletim sistemi hücreleri, efferent, intrinsik ve afferent nöronlar), iletken (yani, fibroblastlar, yerleşik olan inflamatuvar hücreler, telosit ve perisitler) ve uyarılabilir olmayan hücreler de (yani, vasküler hücreler) dahil olmak üzere farklı yapısal ve işlevsel birbirine bağlı hücre tiplerinden oluşan karmaşık bir ağıdır (Şekil 4.9) (109).

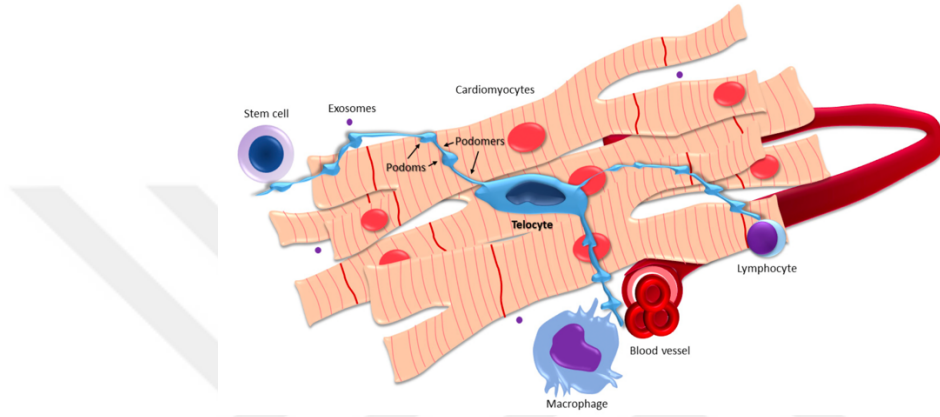


**Şekil 4.9** Miyokardın çok hücreli yapısı (109).

#### 4.8.5.1 Telositler

Telositler (TC'ler), uzun, ince ve moniliform olan telopodlar olarak bilinen belirli bir uzantı türünün varlığı ile karakterize edilen tartışmalı bir hücre tipidir. TC'lerin en belirgin morfolojik özellikleri, göze çarpmayan küçük, iğ şeklinde, yıldız şeklinde, üçgen veya oval hücre gövdesi ve çok uzun, ancak ince uzantılara sahiptir (telopodlar) Farklı morfolojik özelliklere sahip oluşu TC'lerin yaygın ışık mikroskobu tekniklerini kullanarak çalışmasını zorlaştırır (110). Telopodların sayısı, 1-5 arasında değişirken uzunlukları da 10 ila 1000  $\mu\text{m}$  arasında oldukça değişken olabilmekte, kalınlıkları ise 0,1 ila 0,5  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir (110). Bir çok araştırmacı bu hücrelerin varlığını farklı organ ve dokularda karakterize etmeye çalışmaktadırlar (111–115). "Telositler" terimi, daha önce "interstisyel Cajal benzeri hücreler" (ICLC'ler) olarak tanımlanan hücreleri tanımlamak için 2010'da Popescu tarafından önerildi (116). Bu tür hücrelerin kök hücre nişlerinde bulunduğu ve telopodlar olarak bilinen uzun, ince ve moniliform uzantılarıyla ayırt edilebildiği saptanmıştır (113,117). Bununla birlikte, birkaç araştırmacı, TC'lerin aslında belirli bir hücre tipi olmadığını daha çok tuhaf bir hücre morfolojisi olan hücreler olduğunu öne süren kanıtlar sunmuştur (113,115,118,119). Kardiyak TC'ler önceki çalışmalarda CD34, CD117/c-kit, PDGFRa, PDGFR $\beta$ , vimentin, nanog ve kök hücre antijeni-1 olan sca-1 gibi çeşitli belirteçlerin pozitif ekspresyonu ile ayırt edilmiştir. TC'lerin saptanması için yararlı olduğu düşünülen bazı belirteçlerin (örneğin, vimentin, PDGFRa ve PDGFRp) ayrıca kalpte yerleşik olan perisitlerde de ifade edilmektedir (120,121). CD34, vimentin ve c-kit'in ifadesi endotel hücrelerde de gösterilmiştir (122). Bütün bu çalışmalar ele alındığında TC, perisit ve

endotel hücreler arasında ayırım yapabilen hiçbir belirteç tanımlanmamıştır. Miyokardiyal TC'ler uzun telopodlarını miyokardiyal interstisyumun farklı bileşenleri ve en önemlisi kardiyomiyositlerle temas kurmak için kullanırlar. Elektron mikroskobu ile yapılan çekimlerde epikardiyumda, kök hücre nişlerinde bulunan TC'ler kardiyak progenitör hücrelerini desteklemekle görevli olarak tanımlanmışlardır (123).



**Şekil 4.10** Uzun sitoplazmik projeksiyonlara (telopodlar) sahip bir telositin (TC) tipik morfolojisi (110).

#### 4.8.5.2 Perisitler

Perivasküler mezankimal hücreler, diğer adıyla perisitler, ancak kalp yeniden şekillenmesindeki işlevleri henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, temel kardiyovasküler literatürde nispeten az ilgi uyandırmalarına rağmen, kalpte bulunan en yaygın ikinci hücre tipidir (124). Son çalışmalar, kardiyak perisitlerin kardiyomiyogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (125). Perisitlerin homojen bir popülasyonu temsil edip etmediği, koroner düz kas hücrelerinin kökeni olup olmadığı araştırılmaktadır (126). Yayılmış kardiyak perisit dizilerinin, genellikle anjiyojenik filizlere rehberlik eden özelleşmiş endotelial uç hücrelerinin rolünü üstlendiğine dikkat edilmelidir (124). Ayrıca, perisitlerin in vivo mikrovasküler yapıları desteklediği gösterilmiştir (125). Perisitlerin telositlerden farklı olarak telopod benzeri uzantıları olmamakla birlikte iki boyutlu mikroskobik çekimlerde yanlış

değerlendirmelere sebep olabilmektedir. Bu nedenle perisitler ve TC'ler arasındaki karışıklıktan dikkatli bir şekilde kaçınılmalıdır.

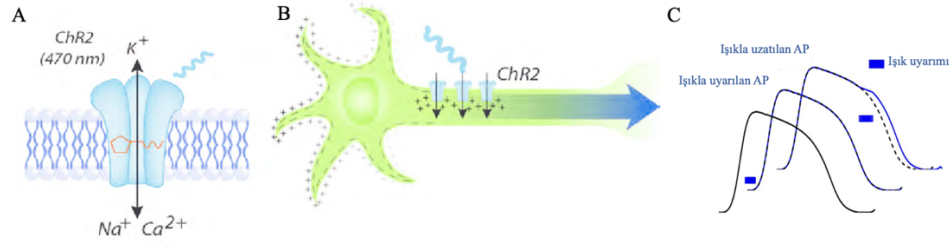
#### **4.9 İşlevsel Kalp Çalışmalarında Optogenetik Uygulamalar**

Optogenetik, ışığa duyarlı proteinleri eksprese eden genetiği değiştirilmiş hücrelerde genetik mühendisliği ve ışık uygulamasının bir kombinasyonu ile biyolojik davranışı kontrol etmek için geliştirilen yeni bir stratejidir. Elektrot tabanlı teknikleri kullanan vagus sinir stimülasyonu (VSS) müdahaleleri, çok sayıda hastalığın tedavisinde klinik etkinlik göstermiştir. VSS epileptik nöbetler ve depresyon tedavisi için klinik olarak onaylanmıştır (127,128). Crohn hastalığı ve romatoid artrit gibi inflamatuvar bozuklukların yanı sıra hipertansiyon ve obezite gibi hastalıklarda yapılan klinik çalışmalar VSS uygulamasının tedavide fayda sağladığını göstermektedir (129). Kalp için, klinik çalışmalar atriyal aritmileri ve kalp yetmezliğini tedavi etmede terapötik potansiyele işaret ederken, klinik öncesi veriler vagal stimülasyonun intrinsik ve duyuşal nöron yeniden şekillenmesini ve kardiyak hipertrofisini azaltarak basınç ve iskemi modellerinde kardiyoprotektif etkileri olduğunu göstermektedir (130). Bununla birlikte, VSS'nin fonksiyonel etkilerinin altında yatan lif türleri ve mekanizmaları ya bilinmemektedir ya da tam olarak anlaşılammıştır. Vagus siniri tarafından inerve edilen organların çeşitliliği ve elektrot stimülasyonunun seçici olmaması nedeniyle, klinikte uygulanan terapiler için hedef dışı birçok lif uyarılır. Mevcut periferik sinir tedavilerinin altında yatan sınırlı mekanik anlayış ve kesin olmayan stimülasyon, daha fazla seçicilik ve özgüllüğe sahip araçlara olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Özgül uyarı yapabilmek için potansiyel bir yol, elektriksel uyarının alternatifi olarak optogenetik araçlar kullanan optik aracılı müdahaledir. Bu tür tekniklerle, hücre tipi spesifik hedefleme ile sinir yollarının ışıkla etkinleştirilmesi veya baskılanması mümkündür.

##### **4.9.1. Optogenetik uyarı sisteminin genetik alt yapısı ve çalışma mekanizması**

Organ düzeyinde yardımcı olan optik haritalamanın aksine, optogenetik, hücresel düzeyde miyokardiyal inervasyon hakkında işlevsel bilgiler sağlar. Optogenetik yöntemler, nöral popülasyonlar gibi spesifik hücre tiplerini *in vivo* olarak aktive etmek veya inhibe etmek için opsin adı verilen ışıkla aktive olan iyon kanallarını kullanır, benzeri görülmemiş ayrıntılarda uzaysal-zamansal çözünürlük sağlar ve yapı-

fonksiyon çalışmasına izin verir (131). Optogenetik, seçilen nöronlarda nöronal aktivasyon veya inhibisyon sağlamak için optik ve genetiği birleştiren güçlü bir nöromodülör teknolojidir (132,133). Optogenetiğin gelişimi, 2000'li yılların başlarından ortalarına kadar ışık kapılı iyonik kanallar gibi davranan mikrobiyal opsinlerin (Channelrhodopsins) keşfedilmesi ve klonlanması ile hız kazanmıştır (132,134). Optogenetik araçlar, memeli nöronlarında nöronal aktiviteyi kontrol etmede kanal rodopsin (channelrhodopsin, ChR2) bazlı ışık uyarımının güçlü etkisini gösteren öncü çalışmadan bu yana hızla gelişti (132,134). Günümüzde optogenetik, sinir devreleri, nöronal fonksiyonlar ve davranışlarla ilgili araştırmalar için hayvan çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, opsin seçimi, gen hedefleme yöntemleri, ekspresyon seviyeleri, ışık verme yaklaşımları ve uygun kontroller, optogenetik çalışmalar yapılırken dikkate alınması gereken başlıca hususlardır. Optogenetik için opsinler, geniş mikrobiyal opsin ailesine ait ışık kapılı iyon kanallarıdır (133,135,136). Nöronal aktivasyon için en yaygın olarak kullanılan opsinlerden biri olarak, yeşil algde tanımlanan ChR2, *in vitro* ve *in vivo* nöral stimülasyonda kullanılan ışık kapılı seçici olmayan bir katyon kanalıdır (132,134,137,138). ChR2'nin kullanım avantajlarından ilki, ChR2'nin ışıkla uyarılması, nöronlarda ifade edildiğinde büyük fotoakımlara ve güçlü depolarizasyona yol açar. Bu, özellikle *in vivo* uygulamalar için kritik olan nöronal aktivasyon için minimum ışık kullanılabileceğinden önemlidir. İkincisi ise, ChR2'nin hızlı aktivasyon ve gevşeme kinetiği nedeniyle, nöronal aktivasyon, bir milisaniye ölçeğinde geçici bir hassasiyetle tekrar tekrar elde edilebilir. Günümüzde, geliştirilmiş fotoakımlar, kinetikler, ışık hassasiyeti ve verimliliğine sahip çok sayıda kanalrodopsin varyantı mevcuttur. Özellikle ChR2 ve bunun varyantları, optogenetikte açık ara en çok kullanılan opsindir. Eşik ışınımının mavi ışığıyla (~470 nm) uyarıldığında, ChR2 kovalent olarak bağlı ışığa duyarlı kromoforu açılır (134). Kanalin açılması, aksiyon potansiyelinin 0 fazında olduğu gibi, Na<sup>+</sup> dahil olmak üzere iyonların hücre zarını geçmesine izin vererek depolarizasyonu başlatır (Şekil 4.10 A B). Bu nedenle, ChR2 eksprese eden hücreler, aksiyon potansiyelini başlatan ve/veya uzatan mavi ışıkla etkin bir şekilde uyarılabilir (Şekil 4.10 C).

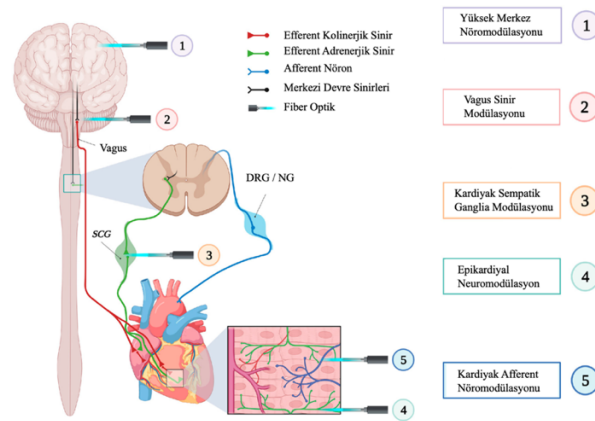


**Şekil 4.11** Aksiyon potansiyelinin optogenetik kontrolü. A. Kanalrodopsinler gibi opsinler, ışık aktivasyonunda  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  gibi katyonları ileterek hücre zarını depolarize eder. B. Depolarizasyon ile sinir hücresinde akson boyunca ışığın etkisi ile açılan opsinler uyarının iletilmesini sağlar. C. Işık uyarısı ile kardiyak aksiyon potansiyeli başlatılabilir veya uzatılabilir. A-B; (136) ve C; (139) yayımından uyarlanmıştır.

#### 4.9.2. Kalbe inerve afferentlerde optogenetik uygulamalar

Kalp homeostazı birçok çok hücreli "devrenin" aktivitesine dayandığından, her hücre tipinin lokalizasyon ve miyokardiyal etkileşimlere göre bireysel rolünün incelenmesi için optogenetik çalışmalardan yararlanılmaktadır. Özellikle, kalbi inerve eden afferent ve efferent nöronların kalp fonksiyonunun fizyolojik kontrolünün altında yatan mekanizmaların aydınlatılması, aritmi nedenlerinin araştırılması ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesi ve çift yönlü olarak "beyin-kalp" etkileşiminin anlaşılması için yapılan optogenetik çalışmalar bilinmezlikleri aydınlatmada büyük önem arz etmektedir. Kalbin optogenetik tabanlı nöromodülasyonu, beyin ve kalp arasındaki kalp fonksiyonunu etkileyen, merkez, periferik ve kalp intrinsik nöronal ağlarına kadar çok sayıda farklı bağlantılarının incelenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 4.11) (109). Merkezi sinir sisteminde bulunan çekirdeklerin kalp fonksiyonu üzerindeki etkilerinin araştırılmasında optogenetik yaklaşımlar kullanılmaktadır. Kalp hızı ve kan basıncı, solunum aktivitesi ile aynı fazda salındığı bilinmektedir. Bu salınımların bir bileşeni, pre-sempatik ve parasempatik kardiyovasküler nöronların aktivitesini sürükleyen solunum nöronları ile merkezi olarak üretilir. Sıçanlarda yapılan *in vivo* ve *in situ* optogenetik inhibisyon ve uyarmanın yanı sıra nöronal izlemenin bir kombinasyonunu kullanarak, inspiratuar ritim üretimi için PreBötzingler Kompleksi (preBötC) çekirdeği oluşturan nöronlarının kardiyovasküler aktiviteyi doğrudan modüle ettiği gösterilmiştir (140). Spesifik olarak, inhibitör preBötC nöronları kardiyak

parasempatik nöron aktivitesini modüle ederken, uyarıcı preBötC nöronları sempatik vazomotor nöron aktivitesini modüle ederek, solunumla aynı fazda kalp hızı ve kan basıncı salınımları oluşturduğu gösterilmiştir (140). Vagal efferent aktivitenin DMV üzerinden seçici stimülasyonu ile etkili bir kardiyο korumanın olduğu Machhada ve grubu tarafından doğrudan gösterilmiştir (141). Bu çalışmada, ışığa duyarlı kanal ChiEF proteinini ifade etmek için DMV nöronları genetik olarak hedeflenmiş, sağlıklı ve miyokard infarktüs (MI) kaynaklı kalp yetmezliği sıçan modelinde kullanarak DMV vagal efferent projeksiyonlarının seçici uyarılmasının sol ventrikül fonksiyonu üzerindeki etkisi çalışılmış (141). MI sonrası DMV nöronlarına ışık uyarısı verilen ve verilmeyen farelerde hasar bölgesi kıyaslandığında %30 daha küçük olduğu gösterilmiş. Bu veriler, DMV'den kaynaklanan vagal efferent aktivitenin uyarılmasının, kalp yetmezliğinde vagus nöron stimülasyonunun terapötik yararını sağlamak için kritik derecede önemli olabileceğini göstermektedir (141). Optogenetiğin hücre tipi özgüllüğünden yararlanan Kay'in grubu, kolinerjik nöronları hedefleyerek ChR2'ni ifade ettirip, fotoaktivasyonla asetilkolin salınımını parasempatik nöronlarda indükleyerek hızlı kalp atımının düşüşüne neden olduğunu gösterdi (142). Aynı yıl Rajendran ve grubu optogenetiği, doku temizleme ve fizyolojik ölçümlerle birleştirerek, kalbi inerve eden vagal afferent ve efferent liflerin daha yüksek anatomik detaylarını elde etti ve böylece kalp nöronal devrelerinin yüksek karmaşıklığını yaptıkları çalışmalarla gösterdi. Kalp atımının nörojenik kontrolünde yer alan mekanizmaların anlaşılmasını geliştirdi (28). Kalpte sağ stellate gangliyonda noradrenerjik nöronların optogenetik olarak uyarılması ile sempatik yolak uyarılıp kalp atım hızında artış olduğu, vagal uyarımda ise düştüğu gösterilmiştir (Şekil 4.12) (28).



**Şekil 4.12** Birden fazla bölgede beyin-kalp ekseninin optogenetik sorgulaması. Optogenetik uygulamalarla tanımlanabilen farklı beyin-kalp bağlantı devrelerinin şematik gösterimi (109).

Optik tekniklerin sunduğu hassasiyetteki avantajlar ve klinik ortamda AAV gen uygulamalarının artmasıyla birlikte, proksimal sinir yollarında hedeflenen optik stimülasyonu kalbe retrograd AAV enjeksiyonu sonrası gerçekleştirilip işlevselliği denenmiştir (33). Fontane ve grubu vagus sinirinin liflerinde proksimal olarak opsinleri iletmek için ventriküler miyokardiyuma retrograd bir AAV (rAAV2-retro) enjeksiyonu yaptıktan sonra kalbe özgü aksonların alt kümelerinin fotostimülasyonunu, servikal vagus sinirine hem tek fotonlu yöntemle, hem de iki fotonlu holografik uyarım kullanılarak uyguladılar (33). Kalp hızı ve elektrokardiyogram (EKG) parametrelerindeki önemli değişiklikler organa özgü uygulama yapılabilirliğini göstermiştir. Retroviral bir yaklaşımla elde edilen vagal yollarda kalbe özgü opsin ekspresyonu, kalbin nöral hedeflemesi ve diğer organların genel uyarı ile etkilenmemesi açısından önemli bir yaklaşımdır.

#### **4.10. Miyokardiyal İnfarktüs**

Miyokard infarktüs (MI) kalp krizi olarak bilinen kalbin koroner arterlerinde kalbe besleyici oksijence zengin kan getiren damarlardaki tıkanıklıklara bağlı gelişen bir olgudur. Miyokard infarktüsü, reperfüzyonlu veya reperfüzyonsuz miyokard iskemisinden kaynaklanan yaygın bir majör kardiyovasküler olaydır ve altta yatan mekanizmaları ve kardiyak yapı ve fonksiyon üzerindeki sonuçlarını daha iyi anlamak için temel ve translasyonel araştırmalara ihtiyaç vardır. Sempatik, parasempatik ve duyuşal sinirler farklı dağılımlara sahiptir ve çeşitli patofizyolojik durumlarda yeniden şekillenme ve rejenerasyon gözlenmektedir. MI takiben otonom ve duyuşal sinir sisteminin düzensizliği aritmogenezde çok önemli bir rol oynar. Küçük çaplı nöronların periferik terminalleri, özellikle doku iltihabı koşullarında bir dizi endojen kimyasal aracı tarafından uyarılır. Miyokard infarktüs durumunda kalbin miyokard dokusu ile birlikte endokard ve miyokardı saran nöronların da patofizyolojik durumdan etkilendiği gösterilmiştir (143–145).



Miyokard enfarktüsü takiben, birçok çalışma, iskemik dokudaki sinir liflerinin hiperinervasyonu veya denervasyonu ile kritik yeniden şekillenmenin kalp disfonksiyonuna katkıda bulunduğunu göstermiştir (146). Daha önceki çalışmalarda insan kalplerinde aritmilerin ortaya çıkmasında kesintili elektriksel yayılma ve ona eşlik eden nöral yeniden şekillenme belirtilmiştir (147,148). MI sonrası yaralı miyokarda dejenerasyon, TH eksprese eden efferent sinir liflerinin yeniden şekillenmesi ve TRPV1 eksprese eden afferent yoğunluğunda bir artış bildirilmiştir (149,150). Miyokardiyal ve sempatik nöral yeniden şekillenme çeşitli hayvan modellerinde (22–24) ve insanlarda (147) iyi tanımlanmış olmasına rağmen, aritmogeneze etkisinin mekanizması ve duyuşal ağın MI sonrası nasıl yeniden şekillendiği belirsizliğini korumaktadır.

Miyokardiyal iskeminin gerçekleştiği bölgede vagal veya AKG afferentlerinin varlığı iskemi sonrası kalpte meydana gelen atım profilini değiştirdiği gösterilmiştir. Kalbin alt (inferiyor) duvarında daha çok vagal duyuş afferentleri yer alıp iskemi sonrası bredikardi gözlemlenmişken, anterior duvarında bulunan AKG duyuş afferentlerin bulunduğu bölgede iskeminin oluşması taşikardi ile sonuçlanmıştır (151).

Fare, sıçan gibi küçük hayvan modellerinde ve köpek, domuz gibi büyük hayvan modellerinde MI modeli oluşturmak için yüzeysel kuru buz uygulaması, sıvı nitrojen ile soğutulmuş metal uygulaması gibi birçok yaklaşım olmakla beraber, en sık kullanılan yöntem geçici ya da kalıcı olarak LAD (Left Anterior Descending) ligasyonudur (152,153). MI modelleri özellikle hastalık patolojisine ait süreçlerin değerlendirilmesinde, yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

#### **4.11. Doku şeffaflaştırma yöntemleri**

Uygun floresan işaretleme ile doku berraklaştırma teknikleri bir arada kullanılarak organ veya dokuların ışık levha floresan mikroskobu (Light Sheet) kullanılarak yüksek çözünürlüklü hacimsel görüntülemesi sayesinde, bir organı oluşturan hücrelerin hücre tipi, şekli, durumu ve dağılımı gibi kapsamlı bilgilere ulaşabilmektedir. Özellikle, Light Sheet floresan mikroskobu ile birleştirilmiş doku temizleme teknikleri, biyolojik araştırma ve patolojik durumlarda bütün organı

oluşturan hücrelerin detaylı araştırılmasında önem kazanmıştır (154). Öncelikle global olarak bir organı oluşturan hücrelerin belirlenmesi ve patolojik durumda farklı hücre gruplarının ayrı ayrı veya toplu olarak değerlendirilmesi özellikle karmaşık sistemlerin ve hastalıkların çözümlenmesinde çığır açacaktır. Beyin gibi karmaşık organların çalışılmasında nöronların aksonlarının organ özelindeki dallanmalarının ve özelliklerinin aydınlatılmasında berraklaştırma sonrası bütünsel detaylı görüntüleme önem kazanmıştır (154).

Hacimsel görüntülemeye şeffaf bir organ hazırlamak için hidrofobik, hidrofilik ve hidrojel bazlı doku temizleme yöntemleri olmak üzere üç ana yaklaşım rapor edilmiştir (154). Bu teknikler kullanım alanları ve kullanılan kimyasallar açısından farklılık göstermekle birlikte ortak amaç organın yağlardan arındırılarak üç boyutlu görüntülenebilir hale getirilmesidir.

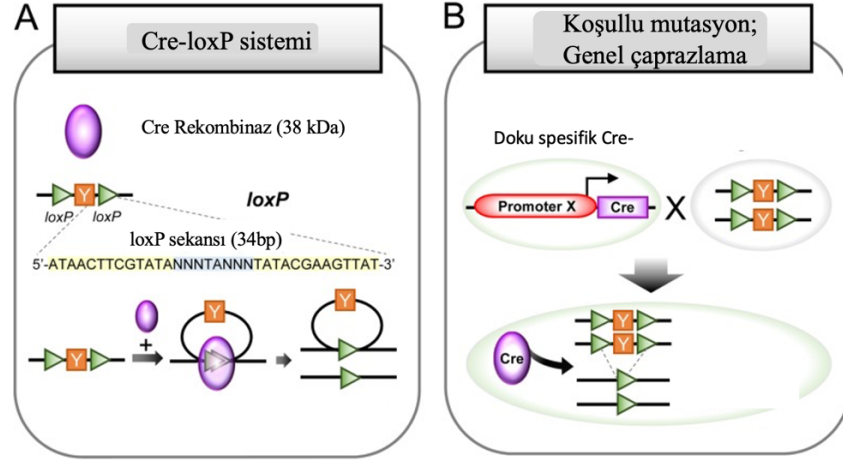
Hidrofobik doku temizleme yöntemlerinden olan BABB (155), 3DISCO (156), uDISCO (157), iDISCO (158) birkaç gün içinde organların yüksek şeffaflıkta olmasını sağlamalarına rağmen tekniklerde kullanılan organik çözücülerin tehlikeli olması ve özellikle şeffaflaştırılan organın boyutunun işlem sonrası küçülmesi bu teknikler için özellikle dezavantajdır.

Hidrojel bazlı CLARITY gibi yöntemler (159) bir hafta gibi kısa sürede organların yüksek şeffaflıkta olmalarını sağlarken tekniksel olarak kullanılan elektroforez yöntemi için özel ekipman gerektirmesi açısından birçok numuneye uygulanması zordur.

Scale (160), SeeDB (161) ve CUBIC (162) gibi hidrofilik bazlı doku temizleme teknikleri poli etilen glikol (PEG) kullanılarak Tuchin ve grubu (163) tarafından geliştirilen doku temizleme teknikleri baz alınarak geliştirilmişlerdir. Hidrofilik yöntemler diğer yöntemlere kıyasla güvenlik, basitlik, ölçeklenebilirlik, düşük çevresel yük ve yüksek şeffaflık gibi özellikler nedeni ile araştırmalarda bu yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Özellikle tüm organ ve tüm vücut numunelerinde yüksek şeffaflığı arttırmak ve işlem süresini kısaltmak için CUBIC reaktifleri ilk rapor edildiğinden beri geliştirilmekte güncellenmektedir (164,165).

#### 4.12.Cre-loxP rekombinasyon sistemi

Cre (Cre rekombinaz), flipaz (Flp) ve D6'ya özgü rekombinaz (Dre) dahil olmak üzere tirozin bölgesine özgü rekombinazlardan (T-SSR'ler) biridir (Meinke ve ark., 2016). Cre rekombinaz bakteriyofaj P1'in cre (siklizasyon rekombinaz) geninden üretilen 38 kDa'lık bir DNA rekombinazı olarak keşfedilmiştir (Sternberg ve ark., 1981). Rekombinaz enzimi LoxP (x-over lokusu, P1) bölgesi olarak adlandırılan spesifik DNA fragman dizilerini tanıır ve iki loxP bölgesi arasında bulunan DNA dizilerini keser. LoxP bölgesi, iki adet 13 bp ters çevrilmiş palindromik tekrar ve bunların ortasında bulunan 8 bp ile birlikte toplamda oluşan 34 bp'lik bir dizidir (Şekil 4.12).

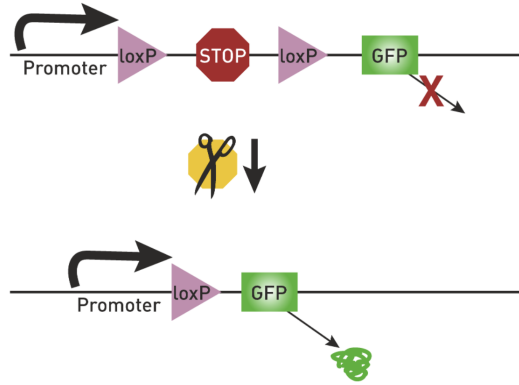


**Şekil 4.13** Cre-loxP sisteminin mekanizması. A. Cre-loxP sistemine genel bir bakış. 38 kDa Cre rekombinaz, spesifik olarak loxP'nin 34 bp'lik DNA dizi bölgelerini tanıır. B. Koşullu mutasyon için loxP ve Cre-bağımlı fare soyu kullanılarak genel üreme stratejisi (166).

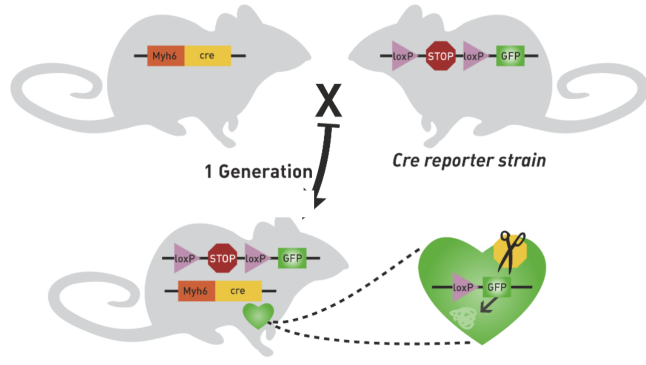
Cre-loxP sistemi, memeli gen düzenlemesi için yaygın olarak kullanılan güçlü bir teknolojidir. Bu sistem, çok basit manipülasyon ve verimli rekombinasyon için ek faktörler gerektirmeyen avantajlara sahiptir (166). Cre-loxP sisteminin mekanizması ile ilgili olarak, tek bir Cre rekombinaz, doğrudan tekrarlanan iki loxP bölgesini tanıır, ardından Cre, loxP çevrili (floxed) DNA'yı keser, böylece dairesel, kesilmiş ve inaktive edilmiş geni taşıyan hücreler oluşturulur. Cre-loxP sistemi ağırlıklı olarak genetik eksizyonda (genetic excision) kullanılırken, loxP bölgelerinin oryantasyonu

ve konumuna bağı olarak DNA'nın iki loxP bölgesi arasında ters çevrilmesini ve translokasyonunu da indükler (167). Zamansal olarak kontrol edilen mutant fareleri oluşturmak için Cre-loxP sisteminde iki elemana ihtiyaç vardır. İlk olarak, Cre rekombinazın spesifik olarak ilgilenilen hücre veya dokuyu hedefleyen bir promotör tarafından eksprese edildiği Cre-bağımlı (Cre-driver) soyu üretilir. İkinci olarak, fare soyu içeren loxP-floxed DNA'nın üretilmesi gerekir.

Genetiği değiştirilmiş transgenik fare modelleri, fareler ve insanlar arasındaki genetik ve patofizyolojik benzerlikler nedeniyle organların detaylı sağlıklı ve hastalık durumunda incelenmesi ve özellikle henüz aydınlatılmamış doku-organ nöron ilişkisinin incelenmesi için yaygın olarak tercih edilir. Özellikle, Cre-loxP sistemi ilgilenilen genlerin bir doku/hücre (uzaysal kontrol) ve/veya zamana (zamansal kontrol) özel bir şekilde araştırılmasını sağlamıştır. Bugüne kadar dokuya özgü çeşitli Cre-bağımlı fare soyları oluşturulmuştur ve yeni Cre hatları hala geliştirilmektedir (166,168). Dokuya özel fareler oluşturmak için Cre rekombinaz fare soyları, Cre rekombinazın yalnızca belirli dokularda aktif olduğunu doğrulamak için yeşil floresan protein (GFP) veya kırmızı floresan protein (tdTomato) ifade eden Cre bağımlı loxP bölgesi içeren soylarla çaprazlanmalıdır. Bu çapraz sonucunda Cre rekombinaz bir loxP-flanked STOP dizisini keserek sistemi aktifleştirir (Şekil 4.13, Şekil 4.14).



**Şekil 4.14** Cre-loxP sisteminin çalışma sistemi (Jax lab)

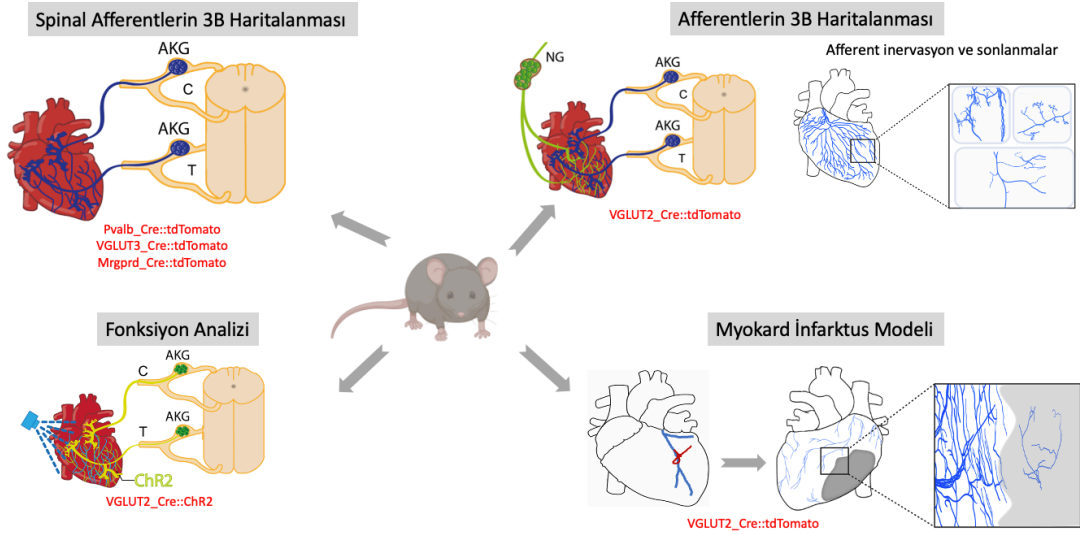


**Şekil 4.15** Dokuya özgü transgenik fare üretiminde cre-loxP sisteminin kullanılması (Jax lab).

## 5. MATERYAL METOT

Bu tez çalışması ile kalbe özgü duyu nöronları transgenik fareler kullanılarak ileri görüntüleme teknikleri ile birlikte global olarak haritalandı. Yüksek çözünürlükte tüm, sempatik ve AKG ve NG kökenli duyu nöronlarının sağlıklı ve MI kalpteki global görüntülenmesi karşılaştırmalı olarak değerlendirilip sağlıklı kalplerden atrium ve ventriküllerdeki sonlanma tipleri detaylı şekilde görüntülendi. Tüm duyu nöronlarından kalbe inerve olan spinal kökenli afferentlerin haritalanması amacıyla q-RT-PCR tekniği ile AKG de NG ye göre anlamlı olarak ifade edilen genlerden 3 tanesi seçilerek temin edilen transgenik hatlarında doğrulamalar yapıp kalp yüzeyinden spesifik görüntülemeler gerçekleştirildi. Bununla birlikte spinal ve vagal kökenli afferentlerin fonksiyon analizleri transgenik ve viral yöntem stratejileri uygulanarak optogenetik yöntemle değerlendirildi.

Tez çalışması kapsamında izlenen basamaklar Şekil 5.1’de grafiksel olarak özetlenmiştir.



Şekil 5.1 Tez çalışmasının grafiksel özeti

### 5.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

Tablo 5.1 Transgenik farelerin genotiplenmesinde kullanılan sarflar

Sarf malzemeler	Firma	Kodu
OneTaq® Hot Start Quick-Load® 2X Master Mix	NEB	M0488L
Yükleme boyası	Thermo Fisher	R0631
Quick-Load 2-Log DNA Ladder	NEB	N0469
Agaroz jel	Multicell	800-015-EG

**Tablo 5.2** *In vivo* operasyonlarda kullanılan alet, sarf ve kimyasallar

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası
Ketasol	Richterpharma	3516
Rompun	Bayer	430720U
Mikro Cımbız	Aesculap	BD333R
Mikro Cımbız	Aesculap	BD331R
Mikro Cımbız	Aesculap	BD329R
Micro Needle holder	Aesculap	FD048R
Makas	Aesculap	FM010R
Emilebilen dikiş ipi 6.0	Pegelak rapid	Q1160
Emilebilen dikiş ipi 5.0	Doğsan	S2160
Terramycin	Pfizer	
Ventilasyon Tüpü	Harvard Apparatus	73-0027
Trakeal Kanül	Harvard Apparatus	73-2830
4-Hydroxytamoxifen	Sigma	H7904
Di-8-ANNEPPQ	Biotium	61014
Tamoxifen	Sigma	T5648

**Tablo 5.3** qRT-PCR işleminde kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

Sarf malzemeler	Firma	Kodu
iScript Advanced cDNA Synthesis Kit	iScript	1708891
Universal Syber Green Supermix	Sso Advenced	172-5271
RNase-DNase free steril su	Sigma	W4502
Eppendorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R
Individual PCR Tubes 8-Tube Strip	Bio-Rad	TLS0801

**Tablo 5.4** İmmun boyamalarda ve görüntülemelerde kullanılan malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Kodu
-----------------	-------	------

Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	A9418
DAPI	Sigma	D9542
Hidrojen Peroksidaz	Sigma	H1009
Keçi serumu	Gibco	16210-064
Paraformaldehit	Sigma	158127
Sodyum Azit	Sigma	S8032
Triton X-100	Sigma	X100
Tween-20	Sigma	P1379
Fosfat Tamponu (PBS)	BioShop	PBS404.100
Glycine	Sigma	G8898
Bloklama tamponu	Thermo	37520
Antibody Diluent Reagent Solution	Life Technologies	3118
Heparin	Mustafa Nevzat İlaç	Nevparin 25.000 IU/ 5 ml
Ultra Saflıkta Agaroz	Invitrogen	16500-100
DMSO	Sigma	D2650
Triethanolamine	Sigma	108379.1000
Quadrol	Sigma	122262
Urea	Sigma	108487.1000
Eppendorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R
15 ml Falkon	Falcon	352096
50 ml Falkon	Falcon	352070
35 mm Cam Petri	WPI	FD35-100

**Tablo 5.5** Görüntülemeye Kullanılan Antikorlar

Antikor	Konak	Firma	Dilüsyon
anti-RFP	Tavşan	Rockland, 600-401-379	1:500
anti-RFP	Keçi	Rockland, 200-101379	1:500
anti-TH	Tavşan	Abcam, ab112	1:500
anti-TUJI	Tavşan	Abcam, ab18207	1:500
anti-Parvalbumin	Fare	Sigma-Aldrich, P3088	1:1000
anti- Vglut3	Tavşan	Merckmillipore, nAB5421-II	1:1000
anti-PGP9.5	Fare	Abcam, ab8189	1:500



Anti Rabbit ALEXA FLUOR PLUS 488	Eşek	Thermo, A32790	1:500
Anti Rabbit ALEXA FLUOR PLUS 647	Eşek	Thermo, A32795	1:500
Anti Goat ALEXA FLUOR PLUS 488	Eşek	Thermo, A32814	1:500
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma	D9542	1:1000

**Tablo 5.6** Bakteri çoğaltma ve virüs yapımında kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası
Amicon Ultra 15ml 100K	MILLIPORE	UFC910024
150 mm petri	Corning	430599
Optimem Medium	Thermo Fisher	31985070
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich	D1556
Benzonase	Sigma-Aldrich	E8263-25 KU
%0.05 Trypsin/EDTA	Gibco	25300054
%0.25 Trypsin/EDTA	Gibco	25200056
Jelatin	Sigma Aldrich	G9391-100g
DPBS (-CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub> )	Gibco	14190-094
DPBS (+CaCl <sub>2</sub> , + MgCl <sub>2</sub> )	Gibco	14040-091
100 mm bakteri petri	Sigma Aldrich, Corning	CLS430167
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen	S33102
D-Sorbitol High Purity	Sigma-Aldrich	BMA2450
Gel Loading Dye Purple (6X)	BioLabs	B7024S
Glutamax	Gibco	35050-61
MEM NEAA	Gibco	11140-050
Na-pyruvate	Gibco	11360-070
P/S	Sigma Aldrich	M3148
Ampisilin (100mg/ml)	Multicell	450-110-EL
Plazmid Isolation Kit	AMBRD Laboratories	10-13-01-010
Plastik Öze	ISOLAB	S.082.01.003.010

100 mm Bakteri Petrisi	Corning	CLS430167
15 ml Falkon	Falcon	352096
50 ml Falkon	Falcon	352070
Cryotube vial	Nunc	363401
T75 flask	Sigma Aldrich, Corning	430725U
DMEM High Glucose	Thermo Fisher	21969035
Plasmid maxi kit	QIAGEN	12162
OptiSeal, Polypropylene Centrifuge tubes (56/cs)	Beckman	361621

## 5.2 Cihazlar

**Tablo 5.7** Analiz ve görüntülemelerde kullanılan cihaz ve yazılımlar

Cihaz/Yazılım Programı	Marka	Model
Konfokal mikroskop	Zeiss	LSM880
Konfokal mikroskop	Zeiss	LSM800
Axio Zoom	Zeiss	V.16 mikroskop
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery V8
Operasyon mikroskobu	Zeiss	Zeiss Stemi 305
Vibratom	Leica	VT1000S
Cryostat	Leica	CM1950
Mouse Ventilator MiniVent Type 845	Harvard Apparatus	73-0043
EKG cihazı	BIOPAC Systems	Inc. MP36
Ultra santrifüj	Beckman	Ti70 rotor
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
Santrifüj	Eppendorf	5810R
Elektroforez cihazı	BIO-RAD	PowerPac
Gerçek zamanlı PCR	Biorad	CFX Connect
T100TM Thermal Cycler	Biorad	1861096
Spectrometre cihaz	BioRAD	
pH metre	Isolab	pH7110
Isıtıcı Plaka	WPI	Hot cold plate

Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Ultrasonikator	Bandelin Sonarex	
Vorteks	Benchmark Scientific	BV1000
Distile Su Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Multipipet	GILSON, pipetman	FA10009
Çalkalayıcı su banyosu	N-Biotek	
Nanodrop	Thermo Scientific	
Mikrodalga Fırın	Samsung	
Fiji	ImageJ	2.0.0-rc 69/1.52i
Matlab	MathWorks	R2018a
GraphPad Prism	GraphPad Software, LLC	Versiyon 8.0

### 5.3. Fare soyları ve Etik Kurul

Hayvanlar üzerinde yapılan tüm deneyler, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 38828770-604.01.01-E.10845 onay numarası alınmış ve Medipol Araştırma Merkezi'nin (MEDITAM) hayvan araştırma tesisinde gerçekleştirilmiştir. Fare kolonileri, hayvanların yiyecek ve suya sürekli erişimi olan 12 saat aydınlık / karanlık döngü odalarında tutuldu. Tüm deneyler için veriler, 8 haftalıktan büyük dişi / erkek yetişkin farelerden toplanmıştır. VGLUT2-Cre (*Slc17a6<sup>tm2(cre)Lowl/J</sup>*, #16963) (89) ve Ai9 (*B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>*, #7909) (92) soyları Jackson Laboratuvarı'ndan (JAX) elde edildi. VGLUT2 ekspres eden afferentleri floresan tdTomato proteini ile genetik olarak etiketlemek için heterozigot VGLUT2-Cre (JAX, #16963) farelerini homozigot Ai9 (CAG-lox-STOP-lox-tdTomato, JAX, #07909) ile çaprazladık ve VGLUT2::tdTomato ikili transgenik fare soyları elde edildi. C57BL/6J vahşi tip soylar, kontrol deneylerinde ve koloni çoğaltma amacıyla çaprazlama için kullanıldı. Cre-negatif yavrular kontrol olarak kullanıldı.

Tüm afferent dalların AKG ve NG özelinde ayrıştırılması ve sadece spinal kökenli olanların çalışılabilmesi için kullanılacak yöntemlerden biri AKG nöronlarının

anterograde işaretlenerek kalbe dallanan aksonlarının takip edilmesi ve görüntülenmesi, bir diğer yöntem ise NG de ifade edilmeyip sadece AKG’de ifade edilen hedef gen bularak bu genin cre transgenik hattı ile yapılacak görüntüleme çalışmalarıdır. Bu tez çalışmasında ikinci yöntem için, kalbi inerve eden duyu nöronlarının RNA-seq analizi daha önce kalbe Di-8-ANEPPQ:1-(3-Trimethylammoniopropyl)-4-[-[2-(di-n-octylamino)-6naphthyl] vinyl]pyridinium (Di-8) boyası verilerek takip edilen AKG ve NG gangliyon hücreleri hücre ayrıştırıcısı ile izole edilip RNA elde edilerek gerçekleştirilmişti (169). RNA-sekans (transkriptom) analizinin sonuçları incelendiğinde tespit edilen gen ifade profillerinin mRNA düzeylerinin incelenmesi ve doğrulanması için q-RTPZR yöntemi kullanılmıştır. Özellikle kalbe dallanan ve genel afferentlerden spinal kökenli olanları ayırt edebilmek için q-RT-PCR analiz sonucuna göre üç adet transgenik fare q-RT-PCR analizinde transkriptom analizi ile tutarlı olarak AKG’de NG’ye oranla anlamlı şekilde yüksek ifade edildiği gösterildikten sonra seçildi (Tablo 5.8).

**Tablo 5.8** Transgenik hatların genlerinin ekspresyonlarının kalbe özgü AKG’lerde q-RT-PCR ile doğrulanması

	DRG_CS1_S4	DRG_CS2	DRG_F_S2	DRG_F_S1	DRG_F_S3	NG_CS_S8	NG_CS_S9	NG_F_S6	NG_F_S7	symbols	gene_name
ENSMUSG0	39.88871303	44.8404	83.3125628	52.1235273	82.6650803	3.70788006	1.04616633	3.47020411	1.80672365	Mrgprd	MAS-related GPR, member D
ENSMUSG0	71.17745393	65.9508	90.8456508	63.9911439	55.8446862	2.677055	1.27472673	2.29637594	1.4998728	Pvalb	parvalbumin
ENSMUSG0	4.543381806	2.38343	4.51969664	6.60456243	8.10479374	0.10423138	0.14479099	0.02535012	0.17720894	Slc17a8	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 8

Tuba Akgül Çağlar’ın doktora tez çalışmasında kalbe geriye doğru giden (retrograd) boya olan Di-8 verilerek işaretlenen AKG ve NG’lerden elde edilen RNA’lar kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. q-RT-PCR sistemine uygun şekilde dizayn edilen primerler kullanılarak mRNA seviyelerine bakıldı (Tablo 5.9) (169).

**Tablo 5.9** Ticari olarak temin edilen farelerin RNA seviyelerinin ölçülmesinde kullanılan qRT-PCR primer sekansları

Gen adı	Forward	Reverse
Gapdh	GAAGGGCATCTTGGGCTA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT
Mrgprd	TTTTTCAGTGACATTTCCTCGCC	GCACATAGACACAGAAGGGAGA
Pvalb-2	TGTCGATGACAGACGTGCTC	TTCTTCAACCCCAATCTTGC
Slc17a8	GGGATGTGGAGTAAGTGGGC	TACTGCACCAATACCCCTGC

Doğrulama işlemleri tamamlandıktan sonra Parvalbumin, Mrgprdtm ve Slc17a8 (Vglut3) genlerine özgü Cre-bağımlı hatları bu süreçte Jax Lab'tan temin ettik (Tablo 5.10). Ticari olarak temin edilen transgenik fare soyları merkezdeki karantina süreleri tamamlandıktan sonra genotiplenip kendi aralarında çaprazlanmalarına bu dönemde başlanmıştır. Yapılan genotiplemede 28534 JAX Lab koduna sahip Slc17a8-ires-Cre-D transgenik hattına ait iki dişinin genotipini vahşi tip olarak belirlendi. Bu nedenle hattın çaprazlamasında transgenik erkekler ile vahşi tip dişiler kullanılmaktadır.

**Tablo 5.10** Ticari olarak temin edilen transgenik fareler

Jaxlab kodu	Transgenik fare hattı	Genotip	Adet	Yaş
17320	Pvalbtm1(cre)Arbr/J	Homozygous	2 dişi-2 erkek	8 haftalık
31286	Mrgprdtm1.1(cre/ERT2)Wq	Heterozygous	2 dişi-2 erkek	8 haftalık
28534	Slc17a8-IRES2-Cre-D	Heterozygous	2 dişi-2 erkek	8 haftalık

#### 5.4. Transgenik Hatların Çoğaltılması, Çaprazlanması ve Genotiplenmesi

Bu tez çalışmasında duyu nöronlarının kalpteki inervasyonlarının haritalanması için kullanılması planlanan fare soyları ikili çaprazlamalar yapılarak elde edilmiştir. Çaprazlama için gerekli hatlara ait transgenik hayvan sayısı yeterli olmadığından ikili (double) transgenik hat oluşturmak için çaprazlamada kullanılacak hatlar da çoğaltıldı. Duyu nöronlarının haritalanmasında kullanılacak ikili transgenik soyların oluşturulma ihtimalini arttırmak için ilk kafeslerden elde edilen ve 8 haftalık olan ikili transgenik hatlar da çaprazlamada kullanıldılar. Tez kapsamında kullanılan transgenik ve ikili-transgenik (double transgenic) soylar üretim kafeslerine alınıp çoğaltıldıktan sonra elde edilen yavrular, bu soyların temin edildiği ticari kuruluş 'The Jackson Laboratory'nin (JAX lab) web sitesinde önerdiği şekilde ve Tablo 5.11'de verilen primerler ile genotip analizi gerçekleştirildi. Bu işlem için 4 haftalık yavruların kulaklarından küçük bir doku parçası forseps ve steril makas yardımı ile alınıp kulak küpe numarası yazılan tüp içerisine aktarılır. DNA izolasyonu için JAX lab'ta önerilen NaOH ile izolasyon yöntemi esas alındı (JAX lab). Kısaca, yavru farelerden temin edilen cilt örneğine 75 µl 25 mM NaOH/0.2 mM EDTA eklendi ve 98°C yarım saat inkübe edildi. Ardından 75µl 40 mM Tris HCl (pH 5.5) eklenerek nötralizasyon gerçekleştirilerek genomik DNA PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) reaksiyonunda kullanılır hale getirildi. Genomik DNA transgenik hayvan hatlarına özgü sipariş edilen

(Tablo 5.11) primerler kullanılarak PZR işleminde kullanıldı. DNA örneklerinden 1 µl alınarak Hot Start Master Mix (New England Biolabs) ve ilgili fare hattının primerleri ile PCR karışımına eklendi. Bütün genotiplenmeler JAX lab'ın önerdiği Touch-down PZR protokolüne (Tablo 5.12) uygun şekilde gerçekleştirildi. PCR ile doğrulaması yapılan transgenik farelerin en az 6-8 haftalık olana kadar bakımları İstanbul Medipol Üniversitesi deneysel hayvanlar merkezi (MEDİTAM) tarafından gerçekleştirildi.

**Tablo 5.11** Transgenik hatların genotiplenmesinde kullanılan primerler

Gen	Primer Sekansı
Pvalb_16210	CCA TTC CCT CAT CCA CAG AG
Pvalb_27606	GAC GCA ATC GTC CGA TCC
Pvalb_49521	CAA ACA AAC TGA ACA GAA ACT CAG G
Mrgprd_39154	GGA TCC GCC GCA TAA CCA
Mrgprd_39155	AGT GCC TGG TCC TGT GGT AG
Mrgprd_39156	GGA GCC AAA TCA CCA ATG AG
Slc17a8_29731	AGA TGT CTT ATG GAG CCA CCA C
Slc17a8_29732	CTG AGA CCA AGG TCC ATA TTC C
VGLUT-13007	ACA CCG GCC TTA TTC CAA G
VGLUT-32667	AAG AAG GTG CGC AAG ACG
VGLUT-32668	CTG CCA CAG ATT GCA CTT GA
ChR2_EGFP-C-frwd	CACGAACTCCAGCAGGACCATG
ChR2-rev-2	CATATATCGAGGGTTATCATACTGTGCC
TdTomato_9020	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA
TdTomato_9021	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC
TdTomato_9103	GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC
TdTomato_9105	CTG TTC CTG TAC GGC ATG G
TH-31704	AGT GGC CTC TTC CAG AAA TG
TH-31705	TGC GAC TGT GTC TGA TTT CC
TH-33122	GAG ACA GAA CTC GGG ACC AC
TH-oIMR9074	AGG CAA ATT TTG GTG TAC GG
CHAT-23357	GCA AAG AGA CCT CAT CTG TGG A
CHAT-23358	CAG GGT TAG TAG GGG CTG AC
CHAT-23359	CAA AAG CGC TCT GAA GTT CCT

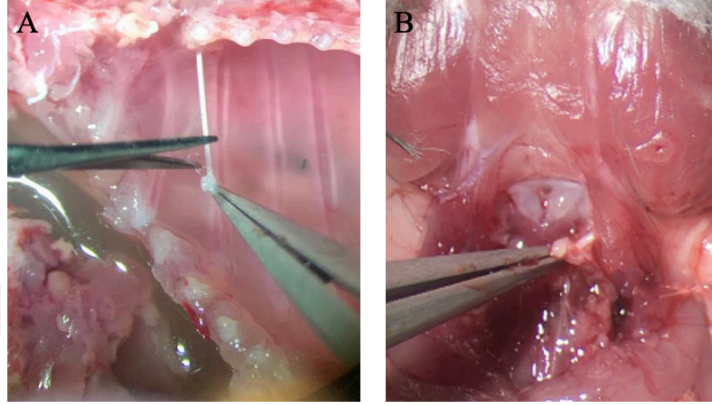
**Tablo 5.12** Genotipleme PZR protokolü

Basamak	Sıcaklık °C	Süre	Not
1	94	2 dk	
2	94	20sn	
3	65	15sn	Her siklus için -0.5 C düşürme
4	68	10sn	
5			2-4 basamakları arası 10 siklus (Touchdown)
6	94	15sn	
7	60	15sn	
8	72	10sn	
9			6-8 basamakları arası 28 siklus
10	72	2 dk	
11	10		

### 5.5 AKG izolasyonu ve in-vitro ortamda kültür edilmesi

AKG izolasyonu için yetişkin 10-12 haftalık transgenik fare ve C57 yabanıl tip fareler ketamine (100mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) anestezi altına alınarak diseksiyon için sabitlenir. Yüz üstü yatırılan farelerin önce deri daha sonra ise servikal bölge kesilerek omurilik açığa çıkarılır. Omurilik temizlenerek sağ ve sol kosta soğuk RPMI1640 içerisine alınır. Stereo mikroskop altında servikal ve toraks seviyesindeki AKG'ler soğuk blok üzerindeki RPMI1640 içerisinde çıkarılarak, soğuk RPMI1640 içerisine alınır. Dokular işleme alınmadan dikseksiyon sırasında gelen sinir fiberleri makas yardımıyla kesilerek ortamdaki uzaklaştırılır (**Şekil 5.2**). Sinir gövdelerini içeren AKG 100 U/mL Tip XI Kolajenaz içerisinde 40 dakika 37 °C'de inkübe edilir. İnkübasyondan sonra dokular Hank's Buffer Salt solüsyonu ile üçer kez yıkanarak enzim ortamdan uzaklaştırılır. 1 mg/ml tripsin enzime içerisine alınan dokular 15 dakika 37 °C'de inkübe edildikten sonra dokular mekanik tritürasyon amacıyla önce kesik mavi uç, daha sonra mavi uçlu ve en son olarak sarı uçlardan geçirildikten sonra insülin enjektöründen geçirilen hücreler 100 lg/mL DNase içerisinde alınarak 37 °C'de 30 dk inkübe edilir. Sinir hücrelerini glialardan ve doku parçalarından ayırmak amacıyla %10, %35 ve %60 perkol gradientine tabii tutulur. Saflaştırma işlemi için hücre süspansiyonu hazırlanan gradiente konuldu ve 1700 RPM'de 20 dakika santrifüj sonunda oluşan beyaz tabakanın altında bulunan sinir hücreleri pipet yardımıyla alınır. Percollün ortamdaki uzaklaştırılması için hücreler NBA eklenerek 1000 RPM'de 3 dakika santrifüj edilir. İzole edilen hücreler sayım sonrasında deney laminin kaplı petri kaplarına besiyeri içerisinde ekilir (Tablo 13).

İmmunositokimyasal boyamalarda ve görüntülemelerde kullanılacak olan AKG'ler yukarıda belirtilen diseksiyon aşaması öncesinde fare %4 PFA ile perfüze edildikten sonra toplanır. Benzer şekilde transgenik farelerin doğrulanmasında gerekli olan NG'de sağ ve sol taraftan olmak üzere iki adet olarak perfüze edilmiş fareden alınır.



Şekil 5.2 Gangliyon diseksiyonu. A. AKG ve B. NG. diseksiyonu.

Tablo 5.13 AKG diseksiyon ve hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri

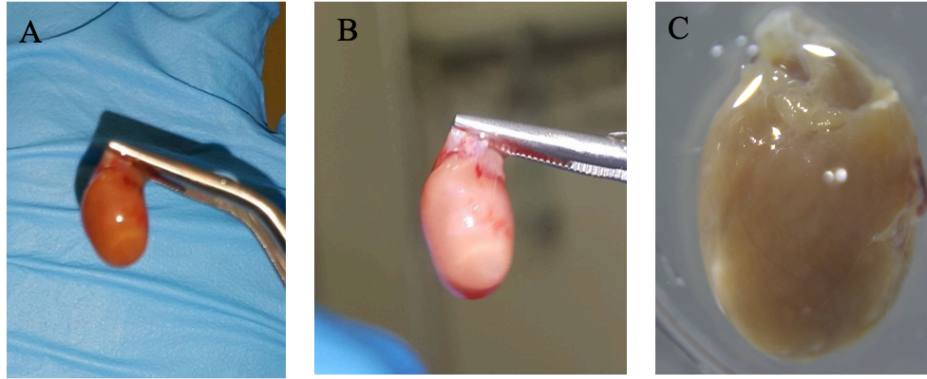
Sarf Malzeme	Miktar	Marka	Katalog Numarası
<b>AKG Diseksiyon Vasatı</b>			
RPMI	%98	Gibco	41966-029
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Sigma Aldrich	M3148
<b>Hücre Ekim Vasatı</b>			
NBA	%94	Gibco	10888-022
B27	%2	İnvitrogen	17504-044
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Sigma Aldrich	M3148



## 5.6. Görüntüleme için doku hazırlama ve immünokimyasal işlemler

### 5.6.1. Perfüzyon

Yabani tip ve transgenik soylardan kalp ve duyu gangliyonları (AKG) toplanmadan önce transkardiyal perfüzyon yapıldı. Kısaca deney farelerine ketamin (50 mg/kg, Pfizer, i.p.) ve ksilazin (5 mg/kg, Bayer, i.p.) kullanılarak anestezi uygulandı. Anestezi derinliği, arka patilerin geri çekilmemesi ve göz refleksleri ile değerlendirildi. Midsternal insizyon yapıldı ve hayvanlar heparinize (Nevparin; 500U) 5 mL salin ve ardından 0.1 M fosfat tamponu (PBS; pH 7.4) içinde taze hazırlanmış 5 ml %4 paraformaldehit (PFA) ile transkardiyal olarak perfüze edildi. Kalbe hasar vermeden perfüzyon işleminin yapılabilmesi için klasik yöntemden farklı olarak kalbe kesik atmak yerine heparin ve PFA enjeksiyonları pulmener damar, aort ve vena kaval aracıyla yapıldı. Perfüze edilen kalbin perfüzyonsuz haline oranla kan hücrelerinden arındığı görülür (Şekil 5.3).



**Şekil 5.3** Görüntüleme için doku hazırlama. A. Perfüzyon öncesi kalp görüntüsü, B. Perfüzyon sonrası kalp görüntüsü, C. Boyama öncesi solüsyon yıkamaları sonrası kalp görüntüsü.

### 5.6.2. İmmünokimyasal boyama

Perfüze edilen farelerden kalp dışında AKG ve NG disekte edildi. Toplanan dokular gece boyunca 4°C'de %4 PFA içinde sabitlendi, birkaç kez PBS içinde yıkandı ve %0.01 sodyum azid içeren PBS içerisinde saklandı. Gangliyonlar transgenik hatların doğrulanmasında kullanıldı. Sabitlenmiş olan kalpler boyama öncesi

durulandı ve 1 gün boyunca PBS içinde tutuldu. Daha sonra kalpler, oda sıcaklığında 2 gün boyunca geçirgen hale getirmek için (permabilization) %0.2 Triton X-100, %20 DMSO ve 0.3 M glisin içeren (Tablo 5.14) PBS içinde tutuldu. Daha sonra, 2 gün boyunca oda sıcaklığında bloke edici tamponda (Thermo #37520) bloke edildi. Kalpler, 2-4 gün boyunca OS (oda sıcaklığı)'de Antikor Seyreltici Reaktif Solüsyonu (Life Technologies #3118) içinde birincil antikor eklenerek (Tablo 1) inkübe edildi. Numuneler daha sonra 1 gün boyunca 10 mg/ml heparin, %0.2 Tween-20 ve PBS (PTwH solüsyonu) ile yıkandı, ardından 2 gün boyunca ikincil antikor içerisinde (Alexa-Fluor Plus (Thermo Fisher), Tablo 1) inkübe edildi. Son olarak, kalpler görüntülemeye önce en az 1 gün PTwH içinde yıkandı. Yabani tip fare kalpleri, tüm nöron popülasyonlarının görüntülenmesi için pan nöronal işaretleyici beta-tubulin (TUJ1) ile boyandı. Çift transgenik (VGLUT2::tdTomato, Pvalb::tdTomato, Mrgprd::tdTomato, VGLUT3::tdTomato) ve vahşi tip (C57BL/6J) fare kalpleri, miyokarddan arka planın üstesinden gelmek için tdTomato floresan sinyalini güçlendirmek için anti-RFP antikorunu ile boyandı. Her immün boyama için tdTomato sinyalini göstermek için negatif ve pozitif kontrol doku boyamaları paralel olarak yapıldı. Global haritalama 5X objektif kullanılarak alınırken, detaylı sinir lifleri ve akson terminalleri, 20X büyütme kullanılarak görüntülendi.

**Tablo 5.14** İmmünokimyasal boyamalarda kullanılan solüsyonların içerikleri

Sarf Malzeme	Miktar
<b>PTx.2 (100ml)</b>	
PBS 1X	100mL
TritonX-100	200uL
<b>PTwH (100ml)</b>	
PBS 1X	100mL
Tween-20	200µL
10mg/mL Heparin	100µL
<b>Permeabilization Solution (10mL)</b>	
PTx.2	8mL
Glycine	0,23 g
DMSO	2mL
<b>Blocking Solution (50mL)</b>	
PTx.2	8.4 mL
Goat Serum	0.6 mL
DMSO	1 ml

Kalbi inerve eden sempatik, parasempatik ve afferentlerin ayrıştırılması amacıyla kalbin 4 farklı antikor ile boyanıp görüntülenmesi planlandı. Konjuge ve tekli olmak üzere farklı dalga boylarında ikincil antikorlarla işaretlenerek fiberlerin görüntülenmesi için antikorların siparişleri verildi. Antikorların kalbi global görüntülemeye yetersiz kaldığı bazılarının hiç boyama gerçekleştirmediği görüldü. Bu nedenle literatür taramalarında en sık kullanılan antikorlar temin edilerek ikili boyama işlemleri optimize edildi. Kalbin global görüntülenmesinde floresan şiddetinin yüksek olması ve özellikle kalbin kas yapısından gelen otoflorasanın düşürülmesi görüntü kalitesini arttıran gereklilikler olarak tespit edildi. Bu doğrultuda çoğunlukla kullanılan Alexa-Fluor ikincil antikorları yerine Invitrogen'in Alexa Fluor Plus antikorları tercih edildi. Alexa Fluor Plus antikorları minimum çapraz reaktivite ile daha yüksek sinyal sağlarken gürültünün de oranını düşürmektedir. 110kDa boyutunda olan F(ab')<sub>2</sub> antikorlarla eşlenik olan Alexa Fluor Plus antikorları küçük boyutları nedeni ile dokulara IgG moleküllerinden daha kolay nüfuz edebilirler ve potansiyel olarak daha fazla antijen bağlama kabiliyetine yol açarlar.

## 5.7. Şeffaflaştırma

Berraklaştırma-şeffaflaştırma uygulamasının görüntülemeye sağlayacağı derinlik üç boyutlu haritalamada önemli katkılar sağlamaktadır. Bu nedenle kalp dokusunda alternatif şeffaflaştırma yöntemleri uygulandı. iDISCO, PACT ve scaleCUBIC yöntemleri detayları aşağıda verildiği gibi denendi.

### 5.7.1. iDISCO yöntemi ile şeffaflaştırma

Renier N. ve arkadaşlarının 2014 yılında geliştirdiği iDISCO yönteminin deneysel basamakları aşağıdaki gibidir (158).

- Heparin ve %4 PFA ile perfüzyon sonrası alınan kalp ve gangliyonlar (AKG ve NG) berraklaştırma işlemi gerçekleştirilmeden önce boyama için 1 gece +4C°'de %4 PFA içerisinde bekletildi.
- Fiksasyon sonrasında 3 kere 30 dk PBS ile yıkayıp yükselen metanol serisinden (1'er saat %20, %40, %60, %80, %100) geçirildikten sonra %66 diklorometan (DCM)/%33 metanol içerisinde gece boyu tutuldu.

- 2 kere 1 saat %100 metanol ile yıkama yapıldıktan sonra metanol içerisinde %5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içerisinde +4C°'de gece boyu tutularak sonrasında azalan metanol serisinden (1'er saat %100, %80, %60, %40 ve %20) geçirildi.
- Dokular permeabilizasyon solüsyonunda (PBS içerisinde %0,1 TritonX-100 ve %0,1 Tween-20) 37C°'de 1 gün bekletildi.
- Ardından bloklama solüsyonunda 1 gün ve primer antikor içerisinde 37C°'de 1 gün bekletilir. Bu işlemler kalp için 2 gün olarak optimize edildi.
- TO-PRO3 ile 3 saat boyunca çekirdek boyandıktan sonra dokular yükselen metanol serisinden geçirilerek dehidre edildi.
- Ardından %66 DCM/%33 metanol içerisinde 3 saat bekletildi.
- %100 DCM içerisinde 2 kere 15 dk bekletilerek metanol uzaklaştırıldı.
- Son olarak dokular dibenzil eter (DBE) içerisine alınarak şeffaflaştırma ve boyama işlemi tamamlandı. Görüntüleme işlemi DBE içerisinde cam petri ile gerçekleştirildi.

### 5.7.2. PACT yöntemi ile şeffaflaştırma

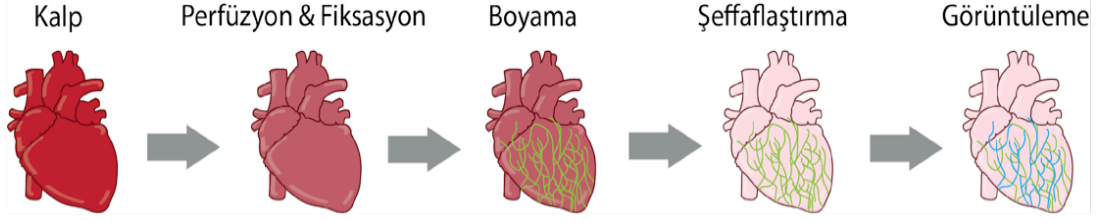
Neckel ve grubunun 2016 yılında yayınladığı protokol takip edilerek kalplerde uygulandı (170). Protokol kısaca; %4 paraformaldehit (PFA) ile perfüze edilip sabitlenmiş olan kalpler, foto başlatıcısı (photoinitiator) %0.25 VA-044 (Wako Chemicals USA) ile desteklenmiş hidrojel monomer çözeltisi A4P0 (PBS içinde %4 akrilamid) içinde gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. A4P0 ile muamele edilmiş kalpler 1-5 dakika nitrojen içerisinde tutularak dokuda ve sıvı içerisinde bulunan gazlar giderildi ve sonra doku-hidrojel hibridizasyonunu başlatmak için 2-3 saat 37°C'de inkübe edildi. Kısa PBS yıkamaları ile fazla hidrojel uzaklaştırıldıktan sonra doku-hidrojel matrisleri, 0.1 M PBS (pH 7.5) içinde %8 SDS içeren 50 ml'lik konik tüplere aktarıldı ve doku boyutuna bağlı olarak 2-5 gün süreyle 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. İmmün boyama için, PACT ile işlenmiş olan kalpler, bir gün boyunca 4-5 tampon değişikliği ile PBS içinde yıkandı ve birincil antikorlar içeren tampona (4 gün), ardından floresan konjuge ikincil antikora (4 gün) aktarıldı.

### 5.7.3. scaleCUBIC yöntemi ile şeffaflaştırma

Perfüzyon sonrası 1 gün boyunca fiksatifte bekletilen kalp PBS ile 2 kez 2 saat boyunca yıkandı. İlk olarak 14 ml yarı yarıya dH<sub>2</sub>O ile sulandırılan scaleCUBIC-1 solüsyonuna alınan kalpler 1 hafta boyunca 2 günde 1 solüsyon değiştirilerek 37°C’de 60rpm çalkalayıcıda tutuldu (Tablo 5.15). İkinci hafta ise 14 ml scaleCUBIC-1 solüsyonuna alınan kalp 37°C’de 60rpm çalkalayıcıda tutuldu. Benzer şekilde 2 günde bir solüsyon değiştirilerek temiz solüsyona alınan kalpler iki hafta sonuna PBS ile yıkanarak solüsyondan arındırılıp boyamaya hazır hale getirildi. İmmunokimyasal olarak boyam işlemleri permabilizasyon, bloklama sonrası birincil antikor ve ikincil antikor eklenmesi ile yapıldı. İmmünboyama işleminden sonra kalpler scaleCUBIC-2 solüsyonuna alınır ve tekrar şeffaflaşması sağlanır. Yeterli şeffaflığa eriştikten sonra kalp scaleCUBIC-2 solüsyonu içerisinde görüntülemeye alındı (Şekil 5.4). Yapılan optimizasyon çalışmaları kalp, beyin, beyin kesiti, AKG dokusu gibi farklı dokularda gerçekleştirildi. Ayrıca görüntülemelerde elde edilen sonuçlar doğrultusunda kalpler boyama işlemi tamamlandıktan sonra scaleCUBIC-1 solüsyonuna alınarak denemeler gerçekleştirildi.

**Tablo 5.15** scaleCUBIC işleminde kullanılan solüsyonlar

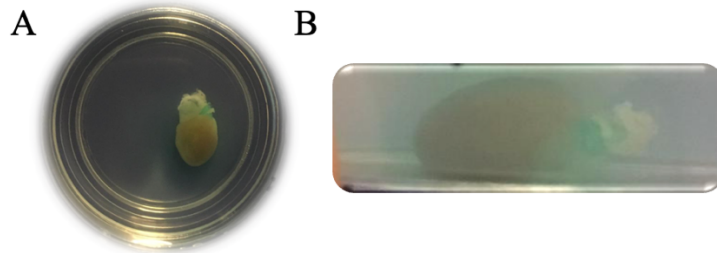
Sarf Malzeme	Miktar
ScaleCUBIC-1 (Solüsyon-1)	
Üre	%25
Quadrol	%25
Triton X-100	%15
ScaleCUBIC-2 (Solüsyon-2)	
Üre	%25
Sükroz	%50
Triethanolamine	%10
Triton X-100	%0.1



**Şekil 5.4** Görüntüleme işlemi için kalbin hazırlanma basamaklarını gösteren diyagram

### 5.8. Mikroskop ve Görüntü işleme

Görüntüleme optimizasyonları kapsamında araştırma merkezimizde bulunan Axiozoom, LSM800 ve LSM880 mikroskoplarında karşılaştırılmalı çekimler yapılarak LSM880 mikroskobunda airyscan modu kullanılarak dorsal ve ventral olmak üzere kalbin iki yönden çekimi 5X objektif ile gerçekleştirildi. İlk çalışmalarda kalpten vibrotom yardımı ile 1mm lik kesitler alınarak her bir kesit ayrı ayrı çekilip görüntü işleme programları (Fiji, iMARIS) yardımı ile birleştirilmesi planlandı. Ancak teknik sıkıntılar nedeni ile bu yöntem uygulanmadı. Son durumda yapılan bütün çekimler kalbin su ile hazırlanan %0.2'lik ultra saf agar içerisine gömülerek sabitlenmesi ile gerçekleştirildi (Şekil 5.5).



**Şekil 5.5** Görüntüleme için kullanılan agar bazlı kalıp. A. Ultra saf agar içerisine gömülmüş kalbin üstten görüntüsü B. Kalbin yandan görüntüsü.

Görüntüler, Airyscan Hızlı mod ile konfokal lazer tarama mikroskobu olan LSM 880 (Zeiss) Plan-Apochromat Fluar 5X/0.16 M27, Plan-Apochromat 20X/0.8 ve Plan-Apochromat 40x/1.3 yağlı objektif olmak üzere üç objektif ile incelendi. Global kalp görüntüleri RFP-IF ve TH-IF veya TUJ1-IF'yi saptamak için 5X büyütmede 488 nm

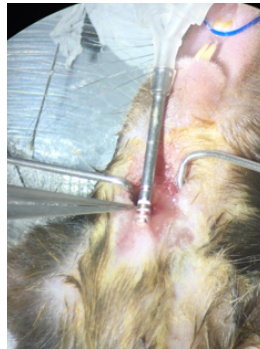
ve 647 nm lazerler kullanılarak çekildi. Floresan emisyonu, RFP için 516-595 nm ve TH veya TUJ1-IR için 654 nm'lik bir bant geçişi ile toplanmıştır. Görüntüler, kalbin boyutuna bağlı olarak 5x6 veya 6x7 kare (tile) ve her bir z-kesit aralığı 10 µm olacak şekilde toplamda 155 ila 210 dilim z-kesiti (z-stack, sinyal yoğunluğuna bağlı olarak) ile çekildi. Lazer gücü, 5X için %100 ve 20X görüntüler için %5-10 arasında olacak şekilde ayarlandı. Sinir lifleri ve sinir terminallerinin detaylı görüntülenmeleri için 1µ aralıkla 100-300 z-kesit içeren belirli alanlar 20X objektif ile çekildi. Tüm görüntüler Airyscan modu ile LSM 880'de toplandıktan sonra Zen Black yazılımında bulunan airyscan processing ile işlendikten sonra z-kesitler maksimum gösterim (maximum projection) oluşturularak yazılımda birleştirildi (Zen Black).

## **5.9. *In vivo* girişimler**

Bütün *in vivo* işlemler 37°C sıcak tabla üzerinde bulunan operasyon masasında ve Zeiss Stemi 305 mikroskobu altında gerçekleştirildi.

### **5.9.1 Trakeostami**

Boynun orta hattından yaklaşık olarak 0,5 cm'lik bir kesi açılarak gerçekleştirilip, kesi ile ortaya çıkan bağ doku disekte edilip tükürük bezleri dış bölgelere ekartör yardımı ile çekilerek trake görünür hale getirildi. Trakede bulunan iki kıkırdak arasından 2 mm'lik bir kesi açılarak boşluk oluşturulup o bölgeye ventilasyon cihazının entübasyon borusu yerleştirildi (Şekil 5.6).



**Şekil 5.6** Trakeostami

### 5.9.2. Torakotomi

Sol axillar bölge ile xiphoid çıkıntı arasında hayali bir çizgi çekilerek çizginin orta noktası belirlenir. 4. ve 5. kaburga kasları arasından kesi yapıldı. Ardından alt katmanlarda bulunan kaslar küt uçlu olan portegü yardımı ile disekte edildikten sonra kaburgalar görünür hale getirilir. İki kaburga arası retraktörler kullanılarak açılmasının ardından kalp gözlemlendi (Şekil 5.7).



Şekil 5.7 Torakotomi

### 5.9.3. Kalbe enjeksiyon

Anestezi altında entübasyon sonrası torakotomi ile kalbi görünür hale getirilen farenin kalbine Hamilton enjektörü virüs / boya enjekte edildi. Operasyondan bir hafta sonra AKG diseksiyonu yapılan hayvanın AKG gövdelerinde Di8 boyası konfokal mikroskobu ile görüntüledi. Virüs enjeksiyonu ise 20ul olacak şekilde (Fast green) hamilton enjektörü yardımı ile kalbin sol ve sağ ventrikül kısmına enjekte edildi (Şekil 5.8).





**Şekil 5.8** Kalbe enjeksiyon

#### **5.9.4. İntratekal Enjeksiyon**

Anestezik madde uygulanan fareler uygulama için hazır olduklarında yüzüstü yatırılarak sırt derisinde orta hizada kesi atılarak omurga üstündeki kaslar görünür hale getirildi. İntratekal enjeksiyon için T6-8 segmenti bulunup diskler arası 45ng 4-OH-Tamoxifen enjeksiyonu Hamilton enjektörü ile yapıldı (Şekil 5.9). Tamoksifen'in hücre geçirgen, aktif bir metaboliti olarak işlev gören 4-OH-Tamoxifen Tamoxifen'den daha güçlüdür ve katalitik alanını değiştirerek PKC'yi inhibe eder.



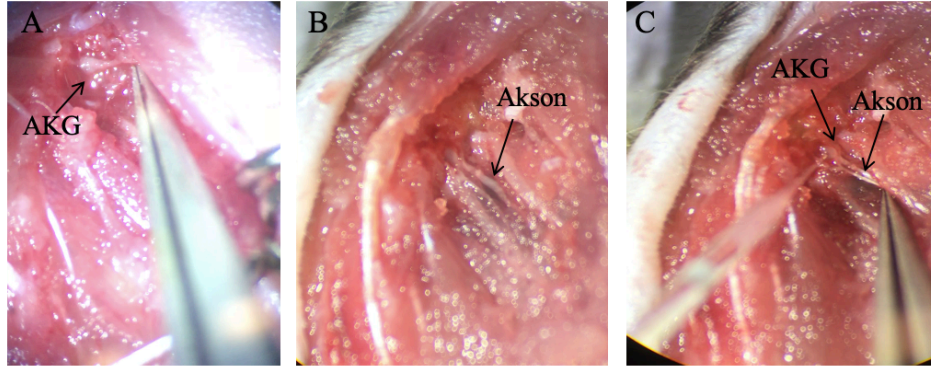
**Şekil 5.9** İntratekal enjeksiyon

### 5.9.5. İntraperitoneal Enjeksiyon

Uyanık fareler uygun pozisyonda hareketsiz şekilde sabitlenip abdomen bölgesinin sağ veya sol alt kadrana insülin enjektörü ile 45 derecelik bir açıyla deriye girilir. Deri altında bir miktar ilerledikten sonra hafifçe itilerek, karın kaslarına geçilir. Peritonda olup olunmadığının doğrulanması piston hafifçe geri çekilip ve enjektör içine kan veya sıvı gelip gelmediğinin kontrolü yapılarak tespit edilir. 0.5 mg Tamoxifen enjeksiyonu 1 hafta boyunca her gün 24 saatte olacak şekilde uygulandı.

### 5.9.6. AKG virüs veya boya enjeksiyonu

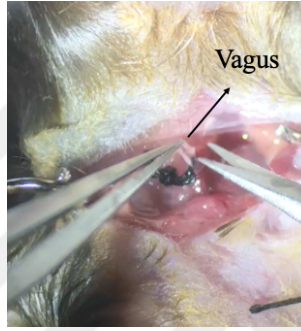
Anestezi uygulanan fareler yüzüstü yatırılıp sırtındaki tüyler tıraş edildikten sonra omurların hizasında dikeyde kesi atıldı. Ekartörler ile deri açılarak kas ligamentleri görünür hale getirildi. Kaslar omurlara dik olacak şekilde forseps yardımı ile açılıp yatayda bulunan kostalar görünür hale getirildi. Kostalarla paralel ilerleyen AKG akson demetleri takip edilerek AKG gövdelerinin üstündeki dokular açıldı. Açığa çıkarılan AKG gövdesi akson demetlerinden forseps yardımı ile gerginleştirilerek boya-virüs enjeksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 5.10). Enjeksiyon sonrası önce kaslar sonrasında da deri dikilerek operasyon tamamlandı.



**Şekil 5.10** AKG gövdesine enjeksiyon. A. AKG gövdesi B. AKG fiber demeti C. AKG gövdesine enjeksiyon uygulaması.

### 5.9.7. Vagatomi

Transgenik fare anestezi altındayken sırtüstü şekilde yerleştirildi ve boyun bölgesi traşlandıktan sonra dikey kesi atıldı. Tükürük bezleri ekartör ile tutturulduktan sonra trakenin sağ veya sol yanında vagus sinirinin alt dalı karotid artere paralel şekilde tespit edilir. Artere zarar vermeden pens yardımı ile ayrılan vagus sinir solunumu baskılamadan hızlıca makas yardımı ile kesilir (Şekil 5.11). Vagus sinirinin iç organların çalışması üzerindeki kritik önemi nedeni ile vagatomi işlemi tek taraflı olarak gerçekleştirildi.

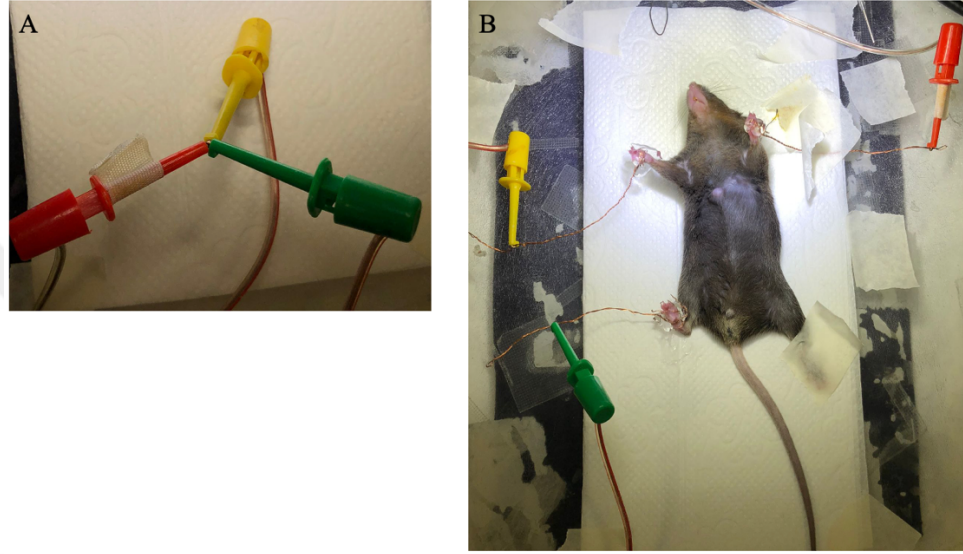


Şekil 5.11 Vagatomi

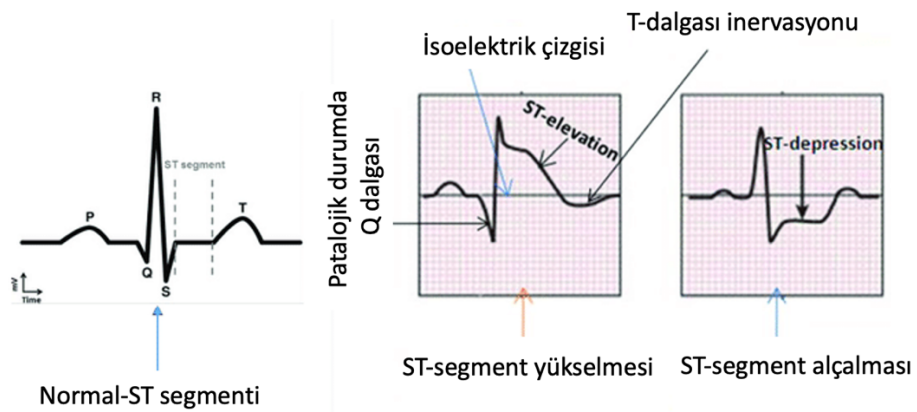
### 5.10. *In Vivo* Girişimlerde Transgenik Fare Soylarında EKG Ölçümlerinin Optimizasyonu

MI girişimi ve optogenetik uygulama öncesi, sırası ve sonrasında alınacak elektrokardiolojik kayıtlar için transgenik fareler, 50 mg/kg ketamin, 5 mg/kg roumpun ile anesteziye alınan transgenik ve yabanıl tip farelerin refleksleri kontrol edildikten sonra EKG kaydı almak üzere ön ve arka ekstremiteleri bant yardımıyla plastik tabaka üzerine sabitlendi. EKG ölçümleri Biopac MP36 System Ins cihazıyla Einthoven üçgeni referans alınarak kaydedildi. Sağ ön ekstremiteye negative elektrot, sol ön ekstremiteye negatif elektrot ve sağ arka ekstremiteye topraklama için nötr elektrot insülin enjektörü yardımıyla subkutan olarak yerleştirildi (Lead I). Elektrodların bağlı olduğu soket, “Kanal 1” girişine takıldı. Cihazın bağlı olduğu bilgisayardan Biopac Student Lab yazılımından “L05” sekmesi seçildi. Cihazın kalibrasyonu sonrası 60 saniye boyunca kayıt alındı. EKG sisteminde insülin enjektör uçları ile kayıt alınmasında yaşanan güçlükler nedeni ile farenin Lead I’e göre kullanılan ekstremitelerinde el ve ayaklar iletken bakır teller yardımı ile sarılıp

iletkenliği arttıracak jel sürüldükten sonra telin diğer ucuna bakır elektrotlar bağlandı (Şekil 5.12). EKG ölçümleri, kayıt cihazının analiz için geliştirilen “Biopac Student Lab” yazılım programı ile incelendi. MI öncesi ve MI sonrası alınan kayıtlarda ST segmentinin izolektrik çizgisine göre farklılığı analiz edildi (Şekil 5.13). Optogenetik uygulama sırasında alınan EKG kayıtları ise atım sayısı ve paterni farklılığına göre analiz edildi.



Şekil 5.12 Transjenik farelerden EKG kaydı alınması. A. Probların kalibre edilmesi, B. Lead I elektrotlarının kayıt almak üzere fareye bağlanması.



Şekil 5.13 Elektrokardiyografi eğrisi. EKG kayıtlarında normal ST-segmenti (sol panel), ST-segment yükselmesi (orta panel) ve ST-segment düşmesi gösterimi (171).

### 5.11. Farelerde kronik MI modelinin oluşturulması

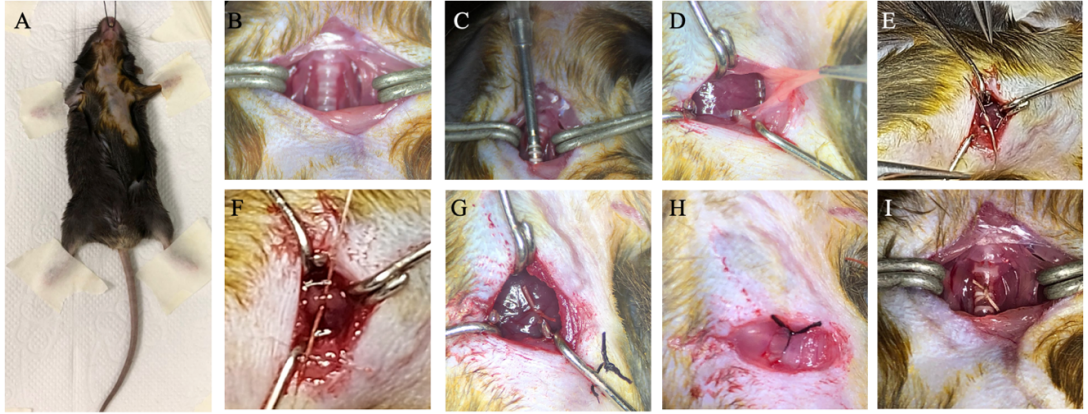
20-28 g ağırlığındaki VGLUT2::tdTomato çift transgenik fareler veya C57BL/6J vahşi tip fareler, kronik MI modelini geliştirmek için kullanıldı (22). Kısaca, anestezi uygulanmış farelerin ketamin (50 mg/kg, Pfizer, i.p.) ve ksilazin (5 mg/kg, Bayer, i.p.) uygulamasından sonra operasyon öncesi elektrokardiyografik ölçümleri kaydedildi (BIOPAC Systems, Inc. MP36). Operasyon sırasında oluşabilecek hipotermiyi en aza indirmek amacıyla fare 37°C'ye ısıtılmış sıcak ped üzerine sabitlendi ve trakeal entübasyon, fareler için MiniVent Ventilatöre bağlı bir endotrakeal tüp kullanılarak gerçekleştirildi (HSE Harvard, Germany). Solunum cihazında bulunan gaz değişim hacmi (Tv- $\mu$ l) ve dakikada verilme ritmi (Beat Per Minute) hayvanın gramına uygun Tablo 5.16'de belirtildiği gibi ayarlandı. Boynun orta hattından yaklaşık olarak 0,5 cm'lik bir kesi açılarak gerçekleştirilip, kesi ile ortaya çıkan bağ doku disekte edilip tükürük bezleri dış bölgelere çekilerek trake görünür hale getirildi. İki kıkırdak arasından 2 mm'lik bir kesi açılarak boşluk oluşturulup o bölgeye entübasyon borusu yerleştirildi. Solunum stabilizasyonunun ardından sol 3-4 interkostal aralık disekte edilerek kalbe ulaşmak için ekartörler yerleştirildi. Daha sonra perikard nazikçe kesilerek kalp sol koroner arter görüntülenmeye uygun pozisyona getirildi. Sol ön inen arter olan (LAD) koroner arter emilmeyen bir sütünle kalıcı olarak bağlandı (Prolene 6/0) (Şekil 5.14). Daha sonra disekte edilen interkostal kaslar sıkıca bastırılarak sütünle edildi (Prolene 5/0) (Şekil 5.15). Son olarak, deri dikildi ve ST segment sapmaları ile MI oluşumunu doğrulamak için LAD ligasyonundan sonra EKG kayıtları alındı. MI öncesi EKG kayıtlarıyla karşılaştırıldığında, MI sonrası farelerde ST segment çöküntüleri tespit edildi. MI prosedüründen 21 gün sonra kalpler perfüze edilerek alındı.

**Tablo 5.16** Solunum cihazında kullanılan değer tablosu. Hayvanın kilosuna göre ayarlanan solunum hacmi ( $\mu$ l) ve solunum hızı (bpm) değerleri

Ağırlık (g)	Solunum Hacmi ( $\mu$ l)	Solunum hızı (bpm)
15	98	159
20	132	148
25	166	140
30	201	133



**Şekil 5.14** Miyokardiyal infarktüs operasyonunda kullanılan cerrahi aletler.



**Şekil 5.15** LAD bağlanarak Miyokard infarktüs modeli oluşturulması. A. Operasyon için boyun ve göğüs kısmı traşlanan fare. B. Trakenin görünür hale getirilmesi. C. Trakeostomi sonrası entübasyon borunun yerleştirilmesi. D. Kalbin görünür hale getirilmesi. E. LAD bağlama işlemi 1. aşama. F. LAD bağlama işlemi 2. aşama. G. LAD'nin bağlanması. H. Kostaların dikilmesi. I. Trakenin dikilmesi.

## 5.12. Rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü üretimi

Addgene firmasından, rekombinant adeno-asosiyasyon virüsü (rAAV) üretiminde kullanılmak üzere, kompetant Stbl3 E. Coli transformasyonu ile yapılmış ve ampisiline dirençli CAG-FLEX-tdTomato, AAV\_GFP-Cre ve pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA ana vektörlerini içeren plazmitler ile

2/9 ve AAV-PHP.S yardımcı vektör ve pHELPER yardımcı vektör plazmitleri ticari olarak Addgene firmasından temin edildi (Tablo 5.17). Periferal sinir sistemini işaretlemek için Rosemary C. Challis ve çalışma arkadaşlarının dizayn ettiği AAV-PHP.S virüs sistemi kullanıldı (172). Çalışmada yayınlandığı şekli ile virüs üretim prosedürü üç ana aşama içerir: 1. AAV üretimi, 2. intravenöz uygulama ve 3. transgen ekspresyonunun değerlendirilmesi.

**Tablo 5.17** Virüs üretiminde kullanılan vektörler

Katolog numarası	Vektör	Özellik
81070	Retro helper-CAP	Yardımcı vektör
112865	AAV2/9	Yardımcı vektör
103006	PHP.S	Yardımcı vektör
28306	Flex-tdTomato	pAAV
49056	AAV_GFP-Cre	pAAV
20298	pAAV-EF1a-doublefloxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA	pAAV
112867	DeltaF6	Helper
AF369965- NovoPro	pHelper	Helper

### 5.12.1. Plazmid DNA çoğaltma

Jel besi yeri içinde bakteriyel sürüntü olarak temin edilen plazmidler plazmid izolasyonu için çoğaltıldılar. LB agar 40 g/L olacak şekilde hazırlandı. Otoklavlanıp soğuduktan sonra 100 µg/ml Ampisilin eklenerek bakteri petrilere döküldü. LB besiyeri 25 g/L olacak şekilde hazırlandı ve otoklavlandıktan sonra kullanıldı. Bakteriyel sürüntü öze yardımıyla Ampisilin eklenen LB besiyerine Addgene protokolüne uygun şekilde ekildi. Petri kapları gece boyunca 37 °C inkübatörde bekletildi. 16-18 saatlik inkübasyonun ardından oluşan bakteri öze yardımıyla toplanıp 2.5 ml LB sıvı besi yeri bulunan inokülasyon tüpüne transfer edildi. Bakteriler sıvı

besi yeri içerisinde, 18 saat boyunca, 37 °C sıcaklık ve 250 rpm koşullarında logaritmik olarak çoğalmaya bırakıldı. Ertesi gün, bakterilerden stok oluşturmak üzere 500 µl alınıp 500 µl su-gliserol karışımı içerisinde cryotüpte -80°C’de donduruldu. Geri kalan 2 ml bakteri 6000 rpm de çöktürülüp DNA izolasyonu elde edildikten sonra doğrulama amaçlı restriksiyon enzimleri ile kesildi. Doğrulama işlemi tamamlandıktan sonra 200 ml LB sıvı besiyeri bulunan cam erlen içerisinde -80°C’deki bakteri stoğundan steril pipet ucu ile bir miktar bakteri eklenip 18 saat boyunca, 37 °C sıcaklık ve 250 rpm koşullarında logaritmik olarak çoğalmaya bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 4 °C sıcaklık ve 6000 rpm koşullarında 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantın atılmasının ardından, pellet halinde dibe çöken bakterilerden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Virüs üretiminde kullanılacak olan tüm vektörler için bu işlemler tekrarlandı.

### **5.12.2. DNA izolasyonu**

rAAV üretimi için bir ana vektör, PHP.S yardımcı vektör ve pHelper yardımcı vektör gerekmektedir. DNA izolasyonunda, kullanılacak vektörleri içeren bakteri pelletleri QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 12162) kullanarak, talimatlar doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyonları nanodrop cihazı ile ölçüldü.

### **5.12.3. HEK293AAV hücre transfeksiyonu**

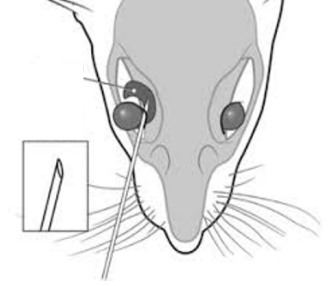
Cell BioLabs firmasından temin edilen HEKAAV hücre hattı (Cell BioLabs, AAV-100), rAAV üretimi için kullanılmaktadır. Bu hücreler transfekte edilmeden önce yeterli sayıda hücre elde edebilmek için hücre kültüründe çoğaltıldılar. D-MEM (yüksek glukoz), %10 fetal bovin serum, 0,1 mM NEAA esansiyel olmayan amino asitler ve 2 mM glutamax içeren vasat ile 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe hücreler çoğaltıldı. Ekspansiyon olarak 1xT75 petri kabındaki hücreler 5XT75 petriye alınıp çoğaltıldılar. Daha sonra bunlardan 4xT75 10x150mm lik petrilere pasajlanarak 2 gün sonra transfeksiyona hazır hale geldiler. İlk olarak, HEK293-AAV hücreleri üç plazmit ile transfekte edilir: (i) ilgilenilen rAAV genomunu içeren pAAV; (ii) viral replikasyon ve kapsid proteinlerini kodlayan pUCmini-iCAP-PHP; ve (iii) replikasyon için gerekli adenoviral proteinleri kodlayan pHelper (Tablo 5.11.1). Bu üçlü



transfeksiyon yaklaşımı kullanılarak, tek sarmallı bir rAAV genomu, HEK293-AAV hücrelerinde bir AAV-PHP.S kapsidine paketlenir. 3 günlük inkübasyonun sonunda hücreler toplandı. 4 °C sıcaklık ve 1100 rpm koşullarında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücre çökeltisine virüs saflaştırılmak üzere liziz solüsyonu eklendi.

#### 5.12.4 Virüs Saflaştırılması

Üretilen virüsler literatürde yayınlanan güncel protokole göre hücrelerin enzimatik ve mekanik yöntemlerle patlatılarak toplanması, saflaştırılması ve kantitatif PCR (q-RTPCR) yöntemi ile titre edilmesi sonrası *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda kullanıldı (172). Saflaştırılmış virüsler, retro-orbital enjeksiyon yoluyla farelere intravenöz olarak verildi ve daha sonra gen ekspresyonu, deneysel amaçlarla ilgili moleküler, histolojik veya fonksiyonel yöntemler kullanılarak değerlendirildi (Şekil 5.16).



Şekil 5.16 Retro-orbital enjeksiyon (173)

#### 5.13. VGLUT2::Chr2-EYFP transgenik fare soyunun vagal stimülasyonu ve EKG kayıtları

VGLUT2::Chr2-EYFP ikili transgenik fareler vagal uyarı öncesi kanalrodopsin aktivasyonu arka ayaklara optik fiber ile 20mW gücünde lazer tutulması ile oluşan ayak çekme davranışı ile kontrol edildi. Vahşi tip farelere de benzer işlem uygulanmasına rağmen benzer davranış görülmediğinden cre aktivasyonu ile kanalrodopsin proteinin perifer dokularda ifadesinin gerçekleştiği görüldü. Halojen içeren anestezi isofluran gaz sistemi kullanılarak farenin ağız ve burnu kapatılacak

şekilde bir sistem ile %5 oranında isofluran verilen transgenik farelerin derin anesteziye girmesi sağlandı. Stabil durumun korunması ile gaz sistemini yardımcı ile isofluran miktarı %1,5 a çekildi. Operasyon boyunca farenin durumu takip edilerek verilen anestezi miktarı artırılıp düşürüldü. Bantlar yardımcı ile sıcak tabla üzerine sabitlenen VGLUT2::ChR2-EYFP transgenik farelerin kollarına bakır teller yardımcı ile EKG elektrotları yerleştirildi. İletkenliği arttırmak için tel ile çevrili fare derisine ultrason jeli olarak da kullanılan EKG jelinden sürüldü. EKG sisteminin monitöründen QRS dalgaları kontrol edildikten sonra lazer uyarı öncesi kontrol durumunu gösteren 60 saniyelik kayıt alındı. İlk olarak farenin boyun bölgesinde dikine doğru kesik atılarak tükürük bezleri ekartörler yardımcı ile yan taraflara çekildi. Görünür hale getirilen trakenin yanında bunun vagus sinirinin alt dalı takip edilip optik fiber aracılığı diod lazer fiber ışık kaynağıyla 50-100 mWatt arasında değişen lazer gücü kullanılarak, 5 ms pulse , 50 Hz olacak şekilde 10 sn boyunca uyarıldı. Uyarı öncesi fiber kaynağının sinire uyarı için uygun pozisyon verilmesi sonrası 10 saniyelik EKG kaydı alınarak sistemin yaratacağı etki ile uyarı sonrası etki karşılaştırıldı. Uyarım sonucunda kalpte meydana gelebilecek kasılıp gevşeme kinetiğindeki değişiklik eş zamanlı EKG ile takip edildi.

### **5.13. Sinir Çapı Analizi**

Fare kalp z-kesitlerinin iki boyutlu maksimum projeksiyon görüntüleri, LSM 880 konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak toplandı ve Zen Black yazılımında üretildi. Daha sonra ImageJ kullanılarak görüntülerin ikili versiyonları oluşturulup nöral izleme analizi için Neutube1.0 yazılımına aktarıldı (28). Programdan elde edilen nöral iz dosyaları, Charles Fowkles tarafından rapor edilen Matlab'da bir komut dosyası kullanılarak akson çapı ve yönelim analizi ve yoğunluk prevalans analizlerinde kullanıldılar (28).

### **5.14. İstatistiksel analizler**

Verilerin istatistiksel analizinde Paired Student t testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 6. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, daha önce literatürde gösterilmemiş kalbe dallanan spinal ve toplam afferentlerin ve sonlanma şekillerinin 3B tüm kalpte yüksek çözünürlük ve daha önce gösterilmemiş detayda haritalanması amaçlanmıştır. Vahşi tip ve üretilen ikili transgenik fare kalplerinin dorsal-ventral yüzünde, atriyum ve ventrikül bölgelerinde afferent fiberleri ve sonlanma tipleri literatürde ilk defa bu kapsam ve detayda VGLUT2 ifade eden kardiyak afferentlerin 3B haritalaması gerçekleştirildi. Spinal kökenli afferent inervasyonun haritalanması için belirlenen transgenik fare hatları çoğaltılıp ikili transgenik fare üretimi için çaprazlandılar. Mrgprd-Cre, Pvalb-Cre, VGLUT3-Cre transgenik fareleri kullanılarak spinal kökenli duyu sinir inervasyonu tespit edilmeye çalışıldı. Kalbin sağlıklı ve MI sonrası spinal-vagal ve sadece spinal afferent dallanmasının belirlenebilmesi amacıyla ikili transgenik fare soylarının üretilmesi, endojen floresan sinyalin antikorlar ile artırılarak ileri görüntüleme teknikleri kullanıldı. Boyama ve görüntüleme teknikleri kalbe inerve olan afferentlerin endokardiyum ve miyokardiyum yüzeyindeki detaylı sonlanmaları tespit etmemizi sağladı. VGLUT2::tdTomato ve vahşi tip farelerde MI sonrası afferent inervasyonun yeniden şekillenmesi kardiyak hasara uzak olan bölgeyle kıyaslanarak incelendi. Bu tez kapsamında üretilen ikili transgenik fareler, kalbe dallanan spinal ve vagal kökenli afferentlerin, sadece spinal kökenli afferentlerin sağlıklı ve MI sonrası görüntülenmesinde kullanılmıştır. 3B görüntüleme ile birlikte fonksiyon analizlerinde kullanılmak üzere lazer uyarılarına duyarlı VGLUT2::Chr2-eYFP ikili transgenik fareler üretilip fonksiyon analizleri gerçekleştirildi. Literatürde eksik olduğunu tespit ettiğimiz kalbin afferent 3B inervasyonunun ve sonlanma çeşitlerinin sağlıklı durumda belirlenmesi ve MI durumunda yeniden şekillenmelerinin incelenmesi ileride fonksiyonel çalışmalara ışık tutacaktır.

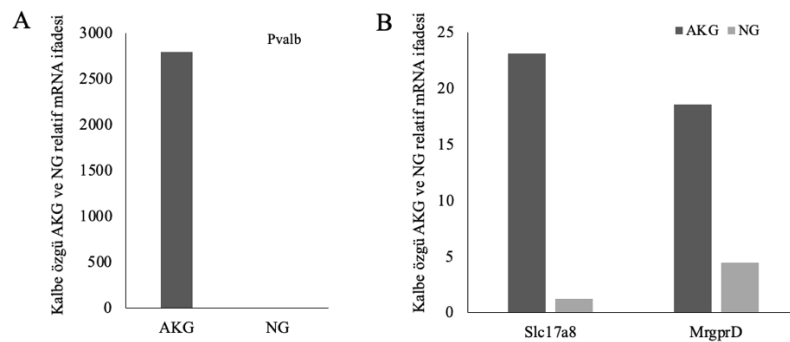
### 6.1. AKG özgü spinal afferentlerin belirlenmesinde kullanılacak transgenik fare soylarının belirlenmesi, üretilmesi ve doğrulanması

Bu tez çalışmasında AKG özgü spinal afferentler ve spinal-vagal kökenli bütün afferentlerin 3B görüntülenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kalbe özgü spinal afferentlerin belirlenmesinde ticari olarak temin edilen 3 transgenik soy ve

MEDİTAM bünyesinde bulunan glutamaterjik afferentlerin işaretlenmesinde kullandığımız VGLUT2-ires\_Cre transgenik fareler üretilip, doğrulama işlemleri genotipleme ve doku özelinde gerçekleştirildi.

### 6.1.1. AKG nöronlarına özgü gen ifadelerinin doğrulanması

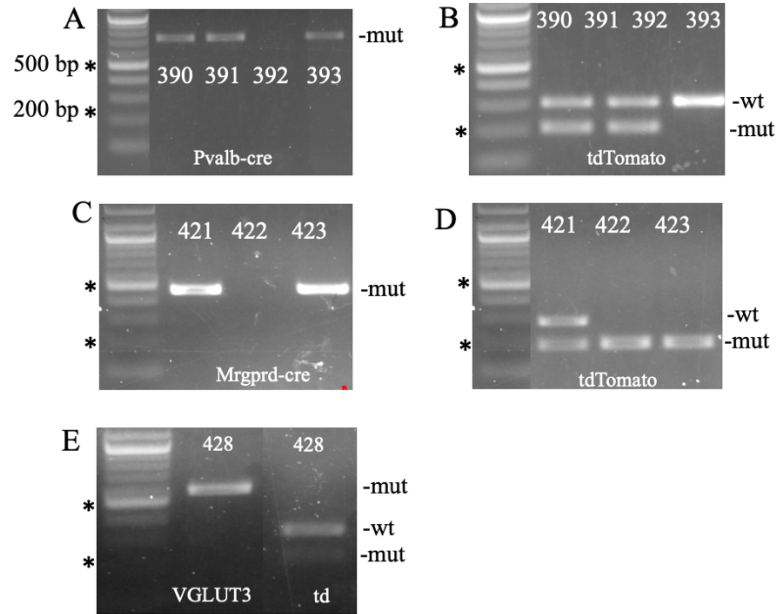
Kalbe dallanan duyu nöronlarının RNA-sekans (transkriptom) analizi daha önce kalbe retrograd ilerleyen Di-8-ANEPPQ boyası verilerek işaretlenen AKG ve NG gangliyon hücreleri hücre ayrıştırıcısı ile izole edilip, hücrelerden elde edilen RNA ile gerçekleştirilmişti (169). Çağlar'ın doktora tezinde AKG ve NG gangliyon gövdelerinde farklı RNA'ların ifadelerinin olduğu ve spinal vagal olarak ayrıştırılabileceği gösterildi. Özellikle kalbin yüzeyinden yapılan işaretleme tekniği sonucunda belirlenen hücrelerin RNA'larından elde edilen verilere göre kalbe inerve afferentlerin spinal ve vagal kökenli ayrıştırılması açısından doktora Transkriptom verisine dayanarak tespit edilen Pvalb, Slc17a8 (VGLUT3) ve Mrgprd genlerinin mRNA düzeylerinin incelenmesi ve doğrulanması için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yöntemi kullanıldı. Genel afferent inervasyondan spinal kökenli olanların ayrıştırılması için transkriptom verisi ve literatür doğrultusunda seçilen genlerin kalbi saran spinal AKG duyu nöronlarında NG nöronlarına göre RNA-sekans verisine paralel şekilde yüksek olarak ifade edildiği tespit edildi (Şekil 6.1 ve Tablo 5.8).



**Şekil 6.1** Kalbe özgü işaretli AKG ve NG mRNA örneklerinde qRT-PCR analizi ile gen ifadelerinin değerlendirilmesi. A. Pvalb geninin AKG ve NG'de ifadesi. B. Slc17a8 (VGLUT3) ve Mrgprd geninin AKG ve NG'de ifadesi.

### 6.1.2. Kalbe özgü AKG afferentlerin görüntülenmesinde kullanılan transgenik farelerin temini, üretimi ve genotiplemesi

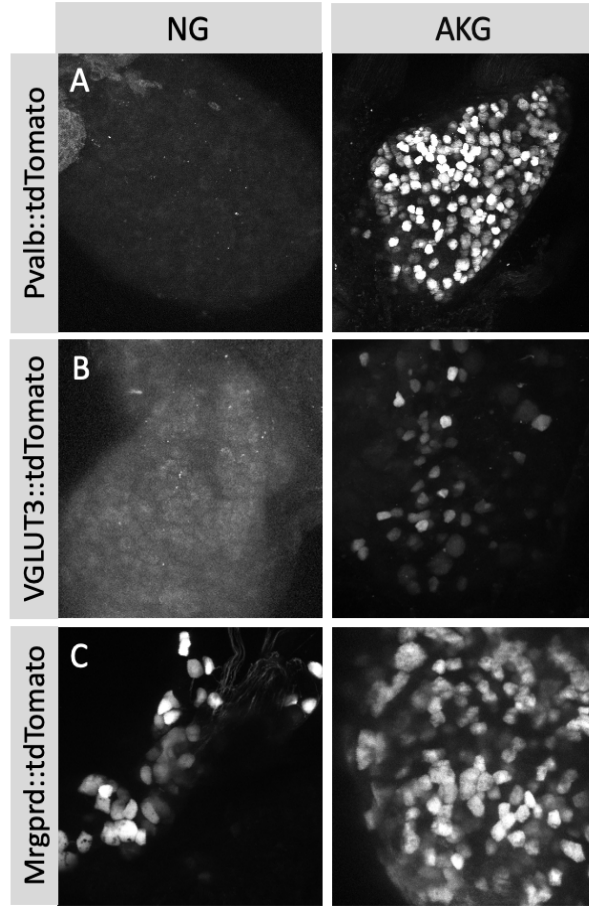
Özellikle kalbe dallanan ve genel afferentlerden spinal kökenli olanları ayırt edebilmek için yapılan qRT-PZR doğrulamasına dayanarak Pvalb, Slc17a8 (VGLUT3) ve Mrgprd genlerinin -cre soylarının ticari olarak temini Jackson laboratuvarından sağlandı (Şekil 6.1). 4 haftalık karantina süreleri dolduktan sonra transgenik fareler firmanın belirttiği şekilde çaprazlandılar. Kullanılan tek ve ikili transgenik fareler 4 haftalık fare yavrularının kulaklarından alınan doku parçasından izole edilen genomik DNA lizatu kullanılarak genotipleme için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı. Transgenik fare soylarının genotip analizinde, her fare soyunda transgen içeren vektör kasetine özel tasarlanmış primer çiftleri kullanılarak yüksek duyarlılıkla doğrulama gerçekleştirildi. Tezde kullanılan Pvalb::tdTomato (Şekil 6.2 A, B), Mrgprd::tdTomato (Şekil 6.2 C, D), Vglut3::tdTomato (Şekil 6.2 E) transgenik fareleri PZR ile doğrulandıktan sonra genotip ve cinsiyet farklılıklarına göre ayrı kafeslere alınarak ortalama 8-16 haftalık olduklarında deneylerde kullanıldılar.



**Şekil 6.2** Üretim sonucu elde edilen ikili transgenik farelerin genotip agaroz jel görüntüsü. A. Pvalb; mut:690bp B. tdTomato; mut: 196 bp, wt: 297 bp. C. Mrgprd; mut:460 bp, D. tdTomato; mut: 196 bp, wt: 297 bp. E. VGLUT3; mut: 557 bp, tdTomato; mut: 196 bp, wt: 297 bp.

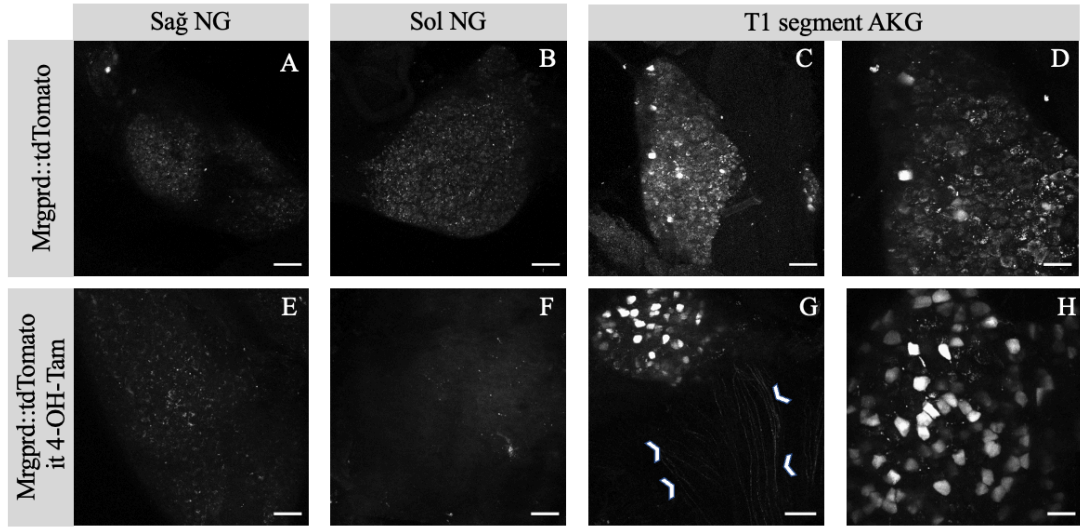
### 6.1.3. Ticari olarak temin edilen AKG özgü transgenik fare soylarında transgen ifadelerinin periferik gangliyonlarda doğrulanması

Tüm afferentlerin haritalanmasında kullanılan VGLUT2-Cre::tdTomato ikili transgenik fare soyu dışında, qRT-PZR ile NG'ye oranla anlamlı şekilde AKG'de ifade edilen genler tespit edilmişti (Şekil 6.1). Ticari olarak temin edilen transgenik soylar kalbe dallanan afferentlerin haritalamasında kullanılmadan önce doku seviyesinde AKG ve NG nöron gövdelerindeki ifadeleri incelendi. Pvalb::tdTomato, VGLUT3::tdTomato ve Mrgprd::tdTomato ikili transgenik hatlarından disekte edilen NG ve AKG nöron gövdelerinde Cre bağımlı tdTomato endojen floresan ifadesi konfokal mikroskobunda görüntülendi (Şekil 6.3). Pvalb::tdTomato ve VGLUT3::tdTomato transgenik hatlarının NG hücre gövdelerinde tdTomato endojen sinyali görüntülenmezken, AKG nöron gövdelerinde tdTomato endojen sinyali konfokal mikroskobu saptandı (Şekil 6.3 A, B). Tamoxifen ile indüklenen Cre rekombinaz içeren Mrgprd-Cre transgenik soyu loxP-tdTomato ile çaprazından elde edilen Mrgprd::tdTomato ikili transgenik farelere literatürde belirtildiği şekilde intraperitoneal (ip) enjeksiyon ile tamoxifen uygulandı. Tamoxifen uygulamasından 1, 2, 4 hafta sonra Mrgprd::tdTomato transgenik fareden disekte edilen AKG ve NG dokuları görüntülendi. AKG'de Cre bağımlı tdTomato ifadesine yoğun olarak rastlanırken, NG'de az sayıda IR soma olduğu görüldü (Şekil 6.3 C).



**Şekil 6.3** NG ve AKG ganglionlarında Pvalb, VGLUT3 ve Mrgprd ekspresyonunun değerlendirilmesi. A. Pvalb::tdTomato B. VGLUT3::tdTomato C. Mrgprd::tdTomato ikili transgenik farelerde NG ve AKG’de, Cre-yönelimli tdTomato proteininin ifadesi.

AKG özgü afferentleri NG özgü veya tüm afferentlerden ayırabilmek için Mrgprd-Cre::tdTomato ikili transgenik farelere ip tamoxifen uygulaması yerine intratekal olarak tamoxifenin aktif formu olan 4-OH-tamoxifen uygulandı. Böylelikle uygulama bölgesi değişikliği ile tamoxifenin bölgesel enjeksiyonu, Cre rekombinaz enziminin NG’da ve kalp kası gibi diğer dokularda aktifleşmeyeceğini ön gördük. Bu doğrultuda 4-OH-tamoxifen uygulaması intratekal olarak yapılan Mrgprd::tdTomato transgenik farelerden kontrol amaçlı NG ve AKG diseksiyonları yapılarak tdTomato ifadesi görüntülendi (Şekil 6.4). İntratekal uygulama sonrası her iki NG hücre gövdelerinde ip tamoxifen uygulaması yapılan farelere oranla Cre bağımlı tdTomato ifadesinin azaldığı ve hiç bir somada ifade edilmediği saptandı (Şekil 6.3 ve 6.4).



**Şekil 6.4** It 4-OH-Tamoxifen enjeksiyonu sonrası NG ve AKG ganglionlarında Mrgprd ekspresyonunun değerlendirilmesi. Üst panel 4-OH-Tamoxifen uygulaması gerçekleştirilmeyen kontrol Mrgprd::tdTomato faresinin NG (A, B) ve AKG'de (C, D) anti-RFP ile işaretlenen tdTomato sinyalini göstermektedir. Alt panel ise (E, F, G, H), it 4-OH-Tamoxifen uygulaması gerçekleştirilmiş fareye ait dokulardır. Ok başları aksonları işaret etmektedir. A-C ve E-G 5X, d ve H 20X objektif ile elde edilen görüntülerdir.

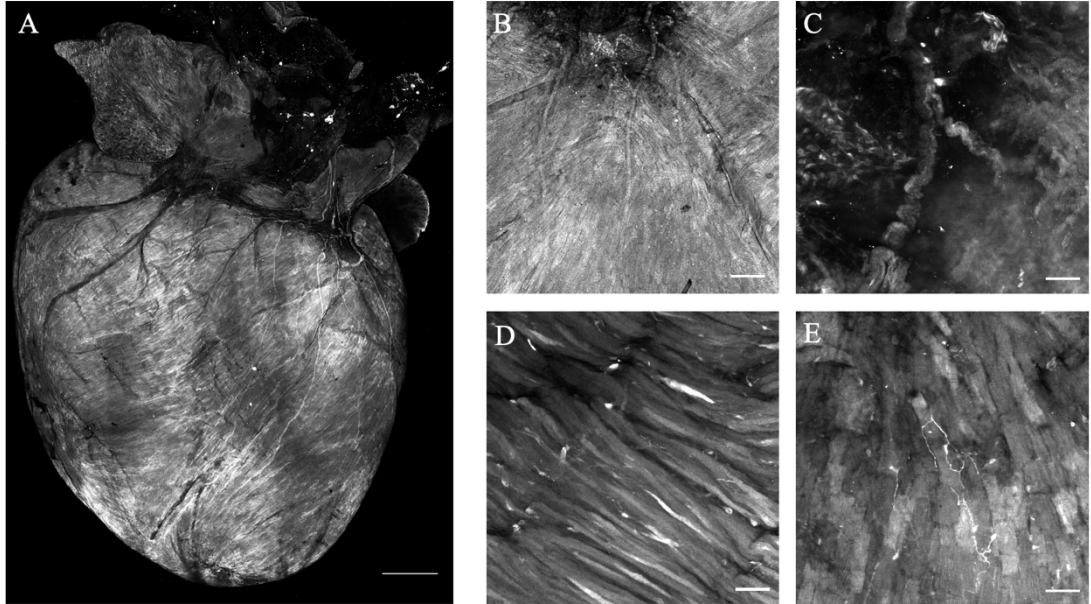
#### 6.1.4. İkili transgenik fare kullanılarak AKG kökenli afferent inervasyonunun kalp yüzeyinde 3B haritalanması

Kalbin spinal afferent inervasyonunun varlığının tespiti ve özellikle sonlanma tiplerinin karakterizasyonu için tüm afferentlerden AKG afferentlerinin ayrımının yapılması literatürde olmayan bu bilgi açısından önemlidir. Bu tez çalışmasının sorularından bir tanesi de bu ayrımı gerçekleştirmek olup bu doğrultuda üretilen ikili transgenik farelerin genotipleme ve gangliyonlar özelinde yapılan doğrulama sonucunda NG'de ifade edilmeyip sadece AKG'de ifade edilen endojen sinyal varlığı dikkate alındı. Sadece AKG gangliyon hücrelerinde ifade edilen Cre rekombinaz bağımlı endojen tdTomato sinyalinin kalp yüzeyindeki inervasyonu LSM880 konfokal mikroskopunda görüntülendi. Ancak trans genlerin sinir fiberleri ile birlikte aynı zamanda kalbin kas hücrelerinde veya arasında ifade ediliyor oluşu fiberlerin global görüntüsünün 3B elde edilmesini engelledi. Kalbin AKG kökenli afferentler ile inerve edildiği 20X objektif ile yapılan yakın çekimlerle gösterilirken global harita net olarak elde edilemedi.



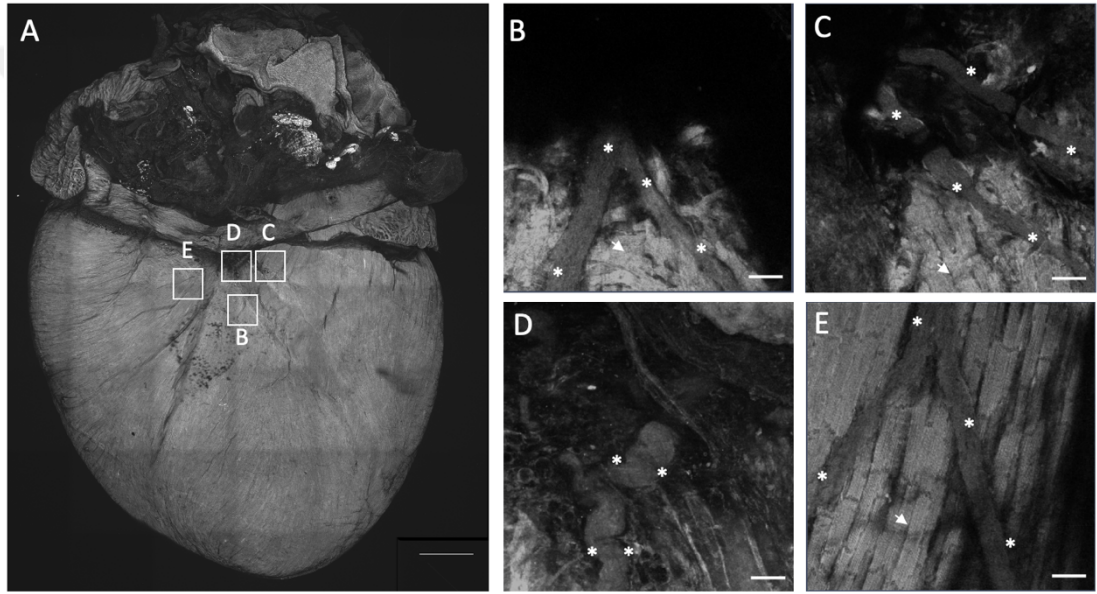
#### 6.1.4.1 Mrgprd<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik farelerde kalbe inerve afferentlerin görüntülenmesi

Kalbin tüm organ seviyesinde AKG kökenli nosiseptif duyu bilgisinin aktarıldığı afferentlerin kardiyak inervasyonunun haritalanması amacı ile ticari olarak temin edilen farelerden olan Mrgprd-Cre transgenik faresinin loxP-tdTomato transgenik faresi ile çaprazından elde edilen Mrgprd<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik farelere intratekal (4-OH-Tamoxifen) veya intraperitonal (Tamoxifen) olmak üzere iki farklı tamoxifen uygulaması gerçekleştirildi. Geçmişte yapılan çalışmalara göre tamoxifen uygulamasından bir hafta sonra Cre rekombinaz enziminin aktifleştiği gösterilmiştir (45). Ancak çalışmamızda intraperitonal tamoxifen uygulamasından 1, 2 ve 4 hafta sonra yaptığımız diseksiyonlar sonrası tdTomato sinyalinin anti-RFP ile arttırılması ve akabinde yaptığımız görüntülemeler sonrasında (Şekil 6.5 A) akson fiberleri (Şekil 6.5 B, C) ve kardiyomiyositlerin (Şekil 6.5 D, E) de Mrgprd ifade ettiği saptandı. Kardiyomiyositlerde görülen ifade nedeniyle oluşan arka plan otofloresan sonucunda akson fiberlerin ayrıştırılması gerçekleştirilemedi.



**Şekil 6.5** Mrgprd::tdTomato transgenik farenin ip tamoxifen uygulamasından 30 gün sonra disekte edilen kalbin görüntüleri. A. Mrgprd::tdTomato transgenik fare kalbinin global 5X görüntüsü. B. Atrio-ventriküler alanı inerve eden aksonların 5X görüntüsü. Akson fiberlerinin (C) ve kalp kası hücrelerinin (D, E) 20X büyütme ile detaylı görüntüsü. Ölçek barı A, B:1 mm ve C-E: 50 µm..

İntraperitoneal tamoxifen enjeksiyonu sonrası kalbin yüzeyinde de görüntülediğimiz tdTomato sinyali nedeni ile tamoxifen uygulamasının intratekal yapılarak global yayılımını engelleyip sadece AKG’lerde rekombinaz aktivasyonunun başlatılmasını ve böylelikle sadece kalbe projeksiyonları bulunan afferentlerin görüntülenebilmesini hedefledik. İntratekal enjeksiyonundan 3 hafta sonra disekte edilen kalplerde yapılan görüntülemede afferentlerin belirginleşmediği ve enjeksiyondan 8 hafta sonra kalplerin disekte edilmesi ve görüntülenmesi ile AKG kökenli afferentlerin belirgin şekilde görüntülenmesi gerçekleştirildi (Şekil 6.6).

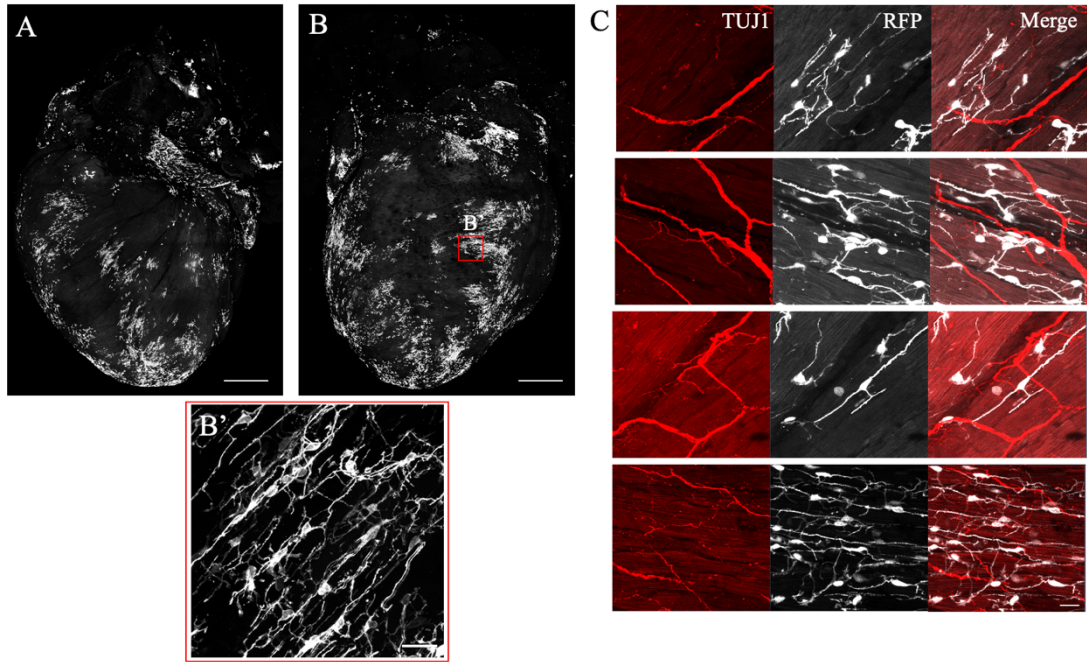


**Şekil 6.6** Mrgprd::tdTomato transgenik farenin it tamoxifen uygulamasından 10 hafta sonra disekte edilen kalbin görüntüleri. A. Mrgprd::tdTomato transgenik fare kalbinin global 5X görüntüsü. B-E. Atrio-ventriküler alanı inerve eden aksonların 20X görüntüsü. Akson fiberleri \* ile işaretli iken, kalbin yüzeyindeki oto floresan oklar ile gösterilmiştir. Ölçek barı A:1 mm ve B-E: 50 µm..

#### **6.1.4.2. VGLUT3<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik fare kullanılarak AKG kökenli afferent inervasyonunun haritalanması**

AKG kökenli afferentlerin haritalanması amacı ile ticari olarak temin edilen farelerden VGLUT3-Cre transgenik faresinin loxP-tdTomato transgenik fare ile çaprazından elde edilen VGLUT3::tdTomato ikili transgenik farenin AKG ve NG’de doğrulama analizleri gerçekleştirildi. tdTomato ifadesinin sadece AKG’lerde olduğu

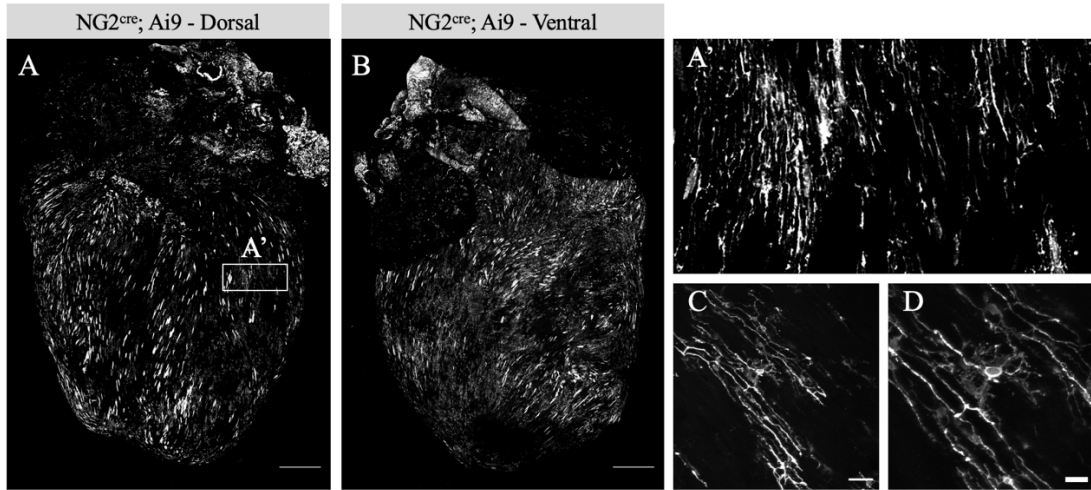
bilateral olarak alınan NG'lerin hiçbir somasında tdTomato ifadesinin olmadığı gösterildi (Şekil 6.3 B). AKG gövdelerinden çıkan aksonların kalbin yüzeyindeki sonlanmalarının görüntülenmesi için tdTomato sinyali anti-RFP ile artırıldı. LSM880 mikroskobu ile gerçekleştirdiğimiz görüntülemelerde sağlıklı VGLUT3::tdTomato transgenik fare kalplerinde uzantıları olan farklı tipte hücreler saptandı (Şekil 6.7). Bu hücrelerin gövde veya uzantılarının aksonlar ile etkileşimini görüntülemek için kalpler anti-TUJ1 antikoru ile boyandılar. tdTomato sinyalinin güçlü oluşu nedeni ile anti-RFP ile boyanmadan bile hücreler ve uzantıları görüntülenebilmektedir. tdTomato sinyali kalbin hem 5X ventral hem de dorsal olarak yapılan çekimlerinde görüntülendi (Şekil 6.7 A, B). 20X büyütme ile elde edilen detaylı görüntülerde VGLUT3 ifade eden hücrelerin TUJ1-IR olan fiberler ile temas halinde olduğu bazı bölgelerde de aksonları çevrelediğini tespit ettik (Şekil 6.7 B', C).



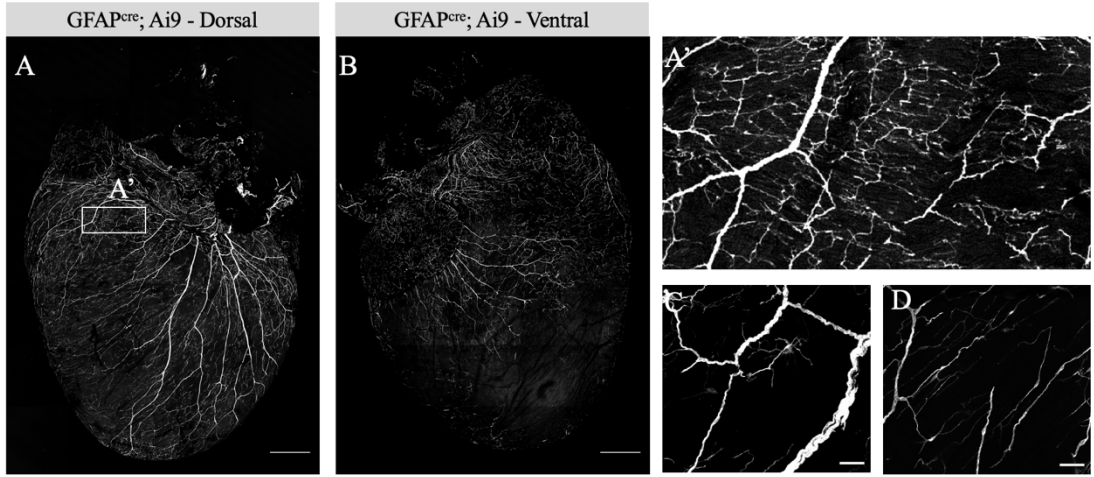
**Şekil 6.7** VGLUT3::tdTomato transgenik fare kalbinin görüntülenmesi. Transgenik fare kalbinin dorsal (A), ventral (B) global görüntüsü. B'. B'de gösterilen alanın 20X büyütme ile yakın çekimi. C. Farklı alanlardan çekilmiş anti-TUJ ile boyanan kalbin sinir ve VGLUT3<sup>+</sup> hücrelerin birlikte görüntüsü. Ölçek barı A, B: 1 mm ve B': 50 µm.

Uzantıları olduğunu tespit ettiğimiz küçük hücre gövdeli ve farklı morfolojilere sahip hücrelerin telosit benzeri hücreler olabileceği ve literatüre benzer olacak şekilde

VGLUT3 proteininin bu hücreler için belirteç olabileceğini düşündük (110). VGLUT3::tdTomato transgenik fare kalbinin yüzeyinde görüntülediğimiz bu uzantılı hücrelerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için GFAP\_Cre (#24098) ve NG2\_Cre (#8533) transgenik fareler loxP\_tdTomato transgenik fare ile çaprazlandı. Bu çaprazlamalardan elde edilen ikili transgenik fareler 8-12 haftalık olduklarında disekte edilip kalpleri anti\_RFP antikoları ile immün boyaması gerçekleştirildi. Literatürde telositlerin tanımlanması için kullanılan özel bir moleküler belirteç bulunmamasına rağmen NG2 ve GFAP proteinlerini ifade ettikleri gösterilmiştir (112,174). Bu sebeple, bu tez çalışmasında VGLUT3::tdTomato transgenik fare kalbinin yüzeyinde görüntülediğimiz hücre tiplerinin NG2::tdTomato (Şekil 6.8) ve GFAP::tdTomato (Şekil 6.9) ikili transgenik fare kalplerinde de benzer paterne sahip olma durumunu değerlendirdik. Bu amaçla ikili transgenik fare kalpleri LSM880 konfokal mikroskopunda 5X ve 20X objektif ile görüntüledi. İlk bulgularımız morfolojik olarak her iki kalbin yüzeyinde görüntülediğimiz hücrelerin VGLUT3 kalbindeki hücreler ile benzediği yönündedir. Ancak moleküler karakterizasyonlarının gelecek çalışmalarda detaylandırılması gerekmektedir.



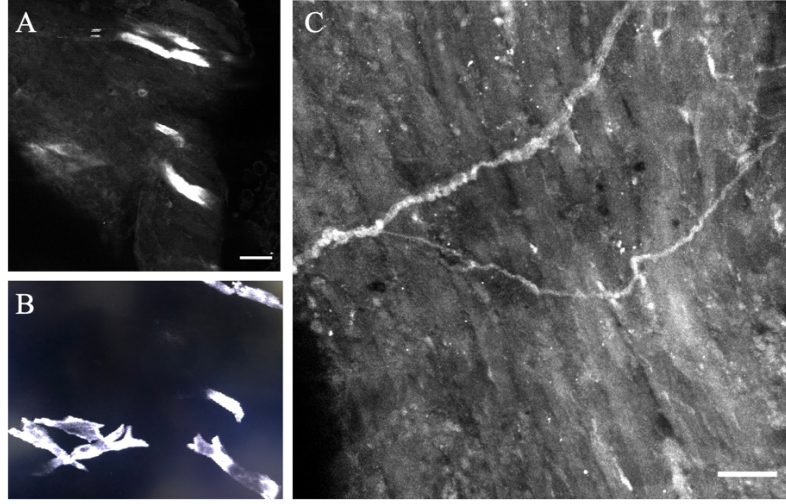
**Şekil 6.8** NG2<sup>cre</sup>;Ai9 ikili transgenik fare kalbinin dorsal ve ventral yönlerinin görüntülenmesi. Kalbin A. Dorsal ve B ventral görüntüsü. A'. A'da gösterilen bölgenin yakınlaştırılmış görüntüsü. C. ve D. 20X objektif ile çekilmiş detaylı görüntüler. Ölçek barları: A ve B: 1 mm, C: 50 µm ve D: 20 µm.



**Şekil 6.9** GFAP<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik fare kalbinin dorsal ve ventral yönlerinin görüntülenmesi. Kalbin A. Dorsal ve B ventral görüntüsü. A'. A'da gösterilen bölgenin yakınlaştırılmış görüntüsü. C. ve D. 20X objektif ile çekilmiş detaylı görüntüler. Ölçek barları: A ve B: 1 mm, C: 50 μm ve D: 20 μm.

#### **6.1.4.3. Pvalb<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik fare kullanılarak AKG kökenli afferent inervasyonunun haritalanması**

RNA sekans ve q-RT-PCR datamıza dayanarak temin ettiğimiz bir diğer transgenik fare olan Pvalb-Cre transgenik faresinin tdTomato fare ile çaprazlanması sonrasında Pvalb::tdTomato ikili transgenik fareler üretildi. Doğrulama amacı ile yapılan bilateral AKG ve NG diseksiyonu ve görüntüleme ile NG'de hiçbir somada Pvalb ifadesine rastlanmadı (Şekil 6.3 A). Sadece AKG somalarında ifade edilip NG'de ifade edilmemesi nedeni ile bu transgenik farenin AKG kökenli afferentlerin kalp yüzeyinde görüntülenebilmesinde kullanılabileceğini gösterdi. Pvalb::tdTomato ikili transgenik fareler perfüze edildikten sonra disekte edilen kalplerde yapılan görüntülemelerde kalbin yüzeyinde 543 lazeri ile uyarılabilen tdTomato ifade eden şiddetli floresana sahip hücrelerin varlığı tespit edildi. Bu hücreler miyosit hücrelerine benzemekle birlikte onlara oranla büyük hücrelerdir (Şekil 6.10 A, C). Anti-RFP antikoruna ile işaretlenen kalp Alexa PLUS antikorunun sağladığı floresan şiddeti yardımı ile ventrikülde ince fiberler görüntüldü (Şekil 6.10 B). Arka plan sinyalinin yoğunluğu nedeni ile akson sinyalleri 5X objektif ile görüntülenemedi.



**Şekil 6.10** Pvalb::tdTomato ikili transgenik fare kalbinin anti-RFP immüno işaretlenmesi sonrası görüntülenmesi. A. ve B. Kalbin yüzeyinde görüntülenen hücreler. C. Ventrikülde görüntülenen Pvalb kontrolünde tdTomato ifade eden fiberler.

Bu aşamaya kadar, spinal afferentlerin belirlenebilmesi için transkriptom verisi değerlendirilerek seçilen ve Jax Lab'tan temin ettiğimiz transgenik farelerin her segmente ait çift taraflı AKG ve NG'leri disekte edilerek Pvalb, VGLUT3 ve Mrgrpd proteinlerinin ifade durumları incelendi. Bu üç protein de transkriptom verisi ile tutarlı olarak AKG nöron gövdelerinde tespit edilirken NG nöron gövdelerinde görüntülenemedi. Yaptığımız detaylı görüntülemeler neticesinde her üç transgenik soya ait kalpte otofloresan arka plan nedeni ile organ boyutunda afferentler görüntülenemezken, yakın plan çekimlerde Mrgrpd-Cre ve Pvalb-Cre bağımlı tdTomato ifade eden aksonlar görüntülenebildi.

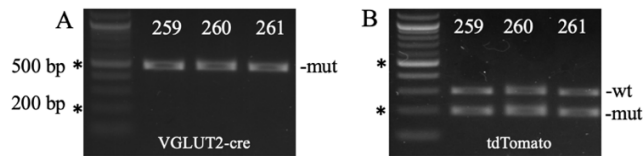
Tez çalışması kapsamında transgenik fare temini, karantina süreçleri ve üretimde yaşanan beklenmedik aksaklıklar, ikili transgenik fare eldesinin uzun sürmesi ve daha önemlisi spinal afferent görüntülemesi amacına hizmet etmemesi nedenleri ile bu yaklaşım yerine bütüncül afferent görüntülemesine olanak veren VGLUT2-Cre fare soyu ile çalışmalara devam edildi.

## 6.2 Afferentlerin bütünsel (spinal-vagal) görüntülemesinde ve fonksiyonel analizlerde kullanılacak fare soyunun üretilmesi ve doğrulanması

Spinal kökenli afferentlerin kalbin yüzeyindeki sonlanmaları ve inervasyonlarının detaylandırma çalışmaları sürecin uzun sürmesi nedeni ile tamamıyla gerçekleştirilemedi. Ancak spinal afferentleri de içine kapsayan genel afferentleri görüntülemeye kullanılan VGLUT2-ires-cre transgenik faresi kullanılarak kalbe inerve spinal-vagal kökenli afferentlerin global görüntüsü ve sonlanmaları yüksek çözünürlüklü görüntülerle elde edildi. İşaretlemede kullanılan cre raportör soyları olan loxP-tdTomato ve loxP-ChR2-EYFP transgenik fare soylarının çoğaltılması ve sonrasında ikili transgenik soy üretimi için çoğunlukla homozigot-homozigot veya heterozigot-homozigot çaprazlanması yapıldı. Ayrıca ikili transgenik gen aktarım ihtimalini artırmak amacıyla yetişkin ikili transgenik fare ile homo tdTomato fare soyları çaprazlandı. Teknik olarak uygun fare soylarının belirlenmesi için çaprazlama sonrası NG, AKG, SG gibi gangliyonların disekte edilerek görüntülenmesi ve kalp yüzeyindeki ifadeleri kontrol edildi.

### 6.2.1 VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farenin üretimi ve genotiplemesi

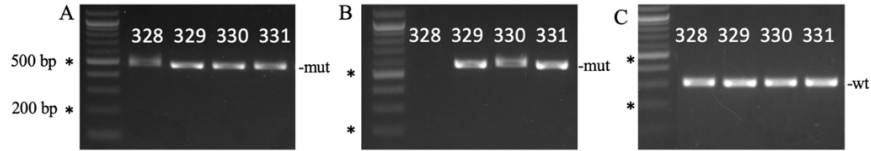
Genomik DNA lizatı kullanılarak genotipleme PZR'ı her fare soyunda transgen içeren vektör kasetine özel tasarlanmış primer çiftleri kullanılarak yüksek duyarlılıkla doğrulama gerçekleştirildi. Tezde kullanılan VGLUT2::tdTomato (Şekil 6.11 A, B) transgenik fareleri PZR ile doğrulandıktan sonra genotip ve cinsiyet farklılıklarına göre ayrı kafeslere alınarak ortalama 8-16 haftalık olduklarında deneylerde kullanıldılar.



**Şekil 6.11** Çaprazlama sonucu elde edilen VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farelerin genotip jel görüntüsü. A. VGLUT2; mut: 500bp B. tdTomato; mut: 196 bp, wt: 297 bp.

### 6.2.2 VGLUT2::ChR2 ikili transgenik farenin üretimi ve genotiplenmesi

Optogenetik uygulamalar için üretilecek transgenik hayvanlarda ChR2 ile birlikte EYFP üretilmesi ChR2 iyon kanalına sahip hücre ve sinir liflerinin görüntülenmesine olanak sağlamaktadır. Üretim sonucunda oluşan ikili transgenik fareler genotiplenerek doğrulandı (Şekil 6.12).



**Şekil 6.12** Çaprazlama sonucu elde edilen VGLUT2::ChR2-EYFP ikili transgenik farelerin genotip jel görüntüsü. A. VGLUT2; mut: 500bp B. ChR2-EYFP; mut:650, C. wt: 300 bp.

### 6.2.3 İkili Transgenik Farelerin Periferik Gangliyonları, Omurilik Ve Beyin Sapında Transgen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

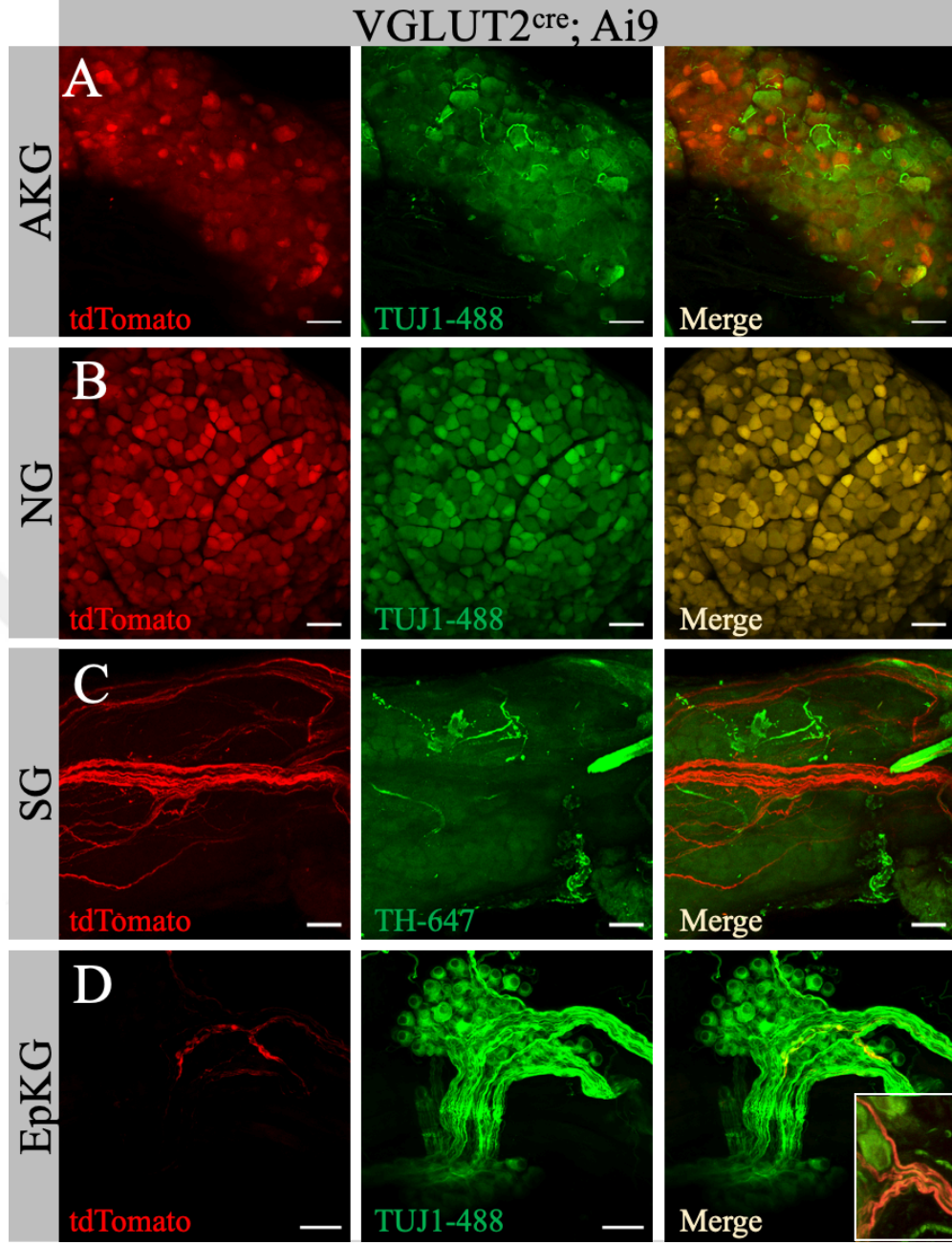
Afferent sonlanmalarının görüntüleme ve fonksiyon analizleri için üretilen VGLUT2::tdTomato ikili transgenik fare soylarının periferik gangliyonlarında transgen ifadeleri AKG, NG, stellat gangliyon (SG) ve epikardiyal gangliyon (EpKG) dokuları perfüzyon sonrası disekte edilip immünokimyasal yöntemlerle işaretlendi. Transgen floresan ifadesi anti-RFP antikorunu kullanılarak artırıldı.

#### 6.2.3.1. VGLUT2::tdTomato transgenik fare soyunda periferik gangliyonlarda VGLUT2 protein ifadesinin değerlendirilmesi

Kalbin VGLUT2 eksprese eden afferentlerinin soma ve aksonal uzantılarını görüntülemek amacıyla VGLUT2-ires-Cre ve tdTomato fareleri (Ai9) çaprazlanarak VGLUT2::tdTomato (VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9) ikili transgenik fare soyları üretildi. VGLUT2::tdTomato transgenik farelerin AKG, NG, SG, ve EpKG dokuları immünokimyasal yöntemler kullanılarak incelendi. VGLUT2-Cre bağımlı tdTomato ifadesinin sinyali anti-RFP antikorunu kullanılarak artırıldı. Dokular anti-RFP antikorunu ile bir pan-nöronal markör proteini olan TUJ1 veya sempatik sinir belirteci olan TH proteinlerine özgü antikorlar ile ikili immünboyama yapılarak incelendi. Öncelikle,

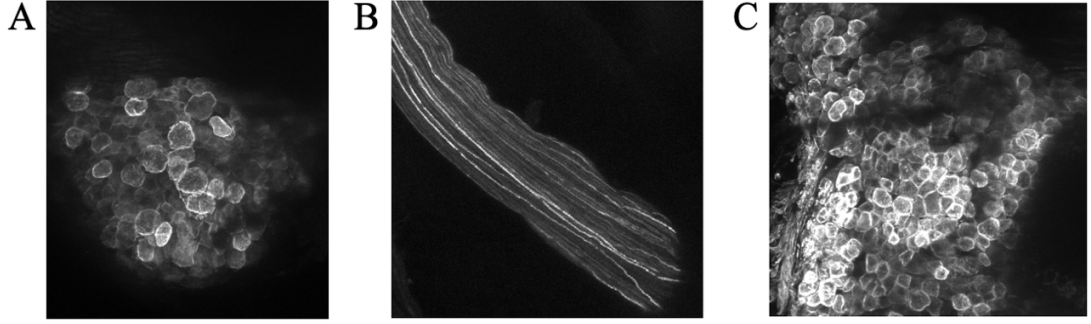


T1-T5 segmentleri arasında yer alan AKG ve bilateral NG afferentlerinde VGLUT2-ires-Cre'ye bağımlı tdTomato ifadesi TUJ1-ifade eden nöron somalarında ve aksonlarında tespit edildi (Şekil 6.13 A, B). Literatür ile uyumlu şekilde kalbe sempatik dallanmanın bilateral olarak SG'den köken aldığı ve afferent hücre gövdesi içermediği izole edilen SG dokusunun anti-RFP ve anti TH ile ikili immünokimyasal boyaması sonucu gösterildi (Şekil 6.13 C) (175,176)). SG'da bulunan hücre gövdeleri sempatik hücre belirteci olan anti-TH için immüno reaktivite (IR) gösterirken, anti-RFP sinyali ise sadece SG'dan geçen afferentlerin akson fiberlerinde tespit edildi (Şekil 6.13 C). Ancak somalarda herhangi bir tdTomato sinyali saptanmadı (Şekil 6.13 C). EpKG'de tdTomato işaretlemesi, sinir liflerinin arasında yer alan demetlerle sınırlıyken, gangliyon nöronlarında anti-RFP antikoru ile artırılan tdTomato sinyali tespit edilmedi (Şekil 6.13 D).



**Şekil 6.13** VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9 transgenik farenin tüm periferik ganglionlarında VGLUT2 ekspresyonu için tdTomato raportör proteininin görüntülenmesi. A. AKG'de, Cre-yönelimli tdTomato proteinini işaretlemek için anti-RFP (kırmızı) antikoru ve pan nöronal işaretleyici anti-TUJ1 (yeşil) antikoru ile B. NG, anti-TUJ1 (yeşil) ve anti-RFP (kırmızı) ile C. SG, anti-TH (yeşil) ve anti-RFP (kırmızı) ile ve D. EpKG, TUJ1 (yeşil) ve RFP (kırmızı) proteinlerine karşı antikolarla immüno boyama gerçekleştirildi. Ölçek çubuğu: 50 µm.

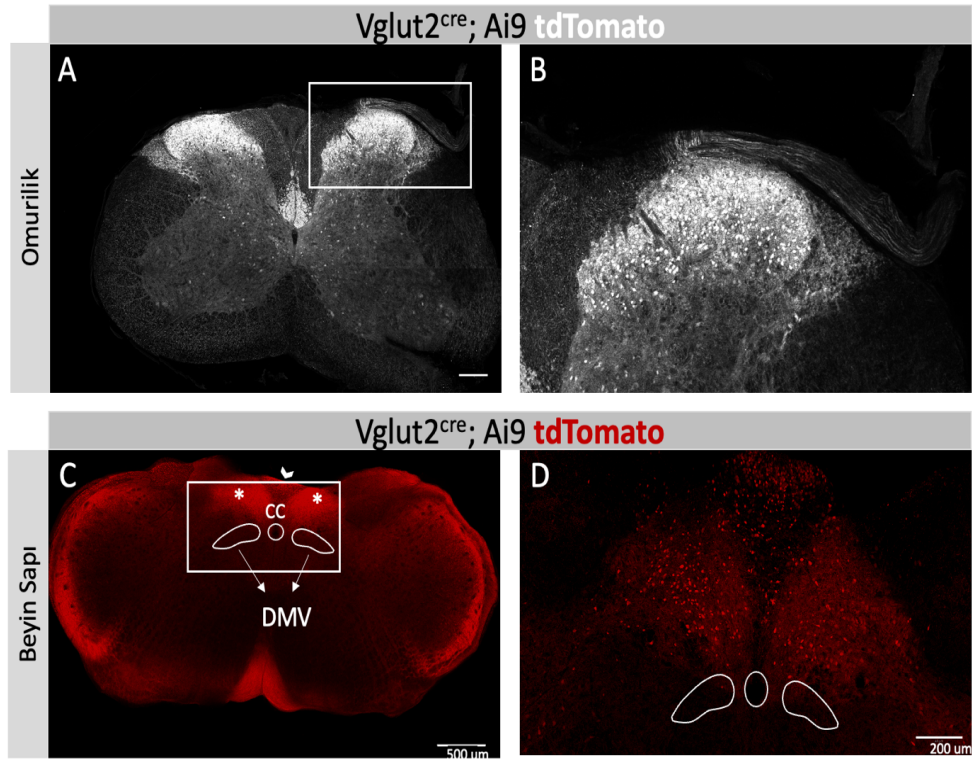
Genotip sonrası ChR2 ifadesinin doğrulanması için AKG ve NG dokuları disekte edildi. ChR2-eYFP füzyon proteini AKG ve NG nöron soma ve akson membranları boyunca konfokal mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 6.14). Genotipleme ve görüntüleme teknikleri ile doğrulanması gerçekleştirilen VGLUT2-Cre::ChR2-eYFP transgenik soyu tez çalışmasında genel duyu sinirlerinin optogenetik uyarımında kullanıldı.



**Şekil 6.14** VGLUT2-Cre::ChR2-EYFP farenin AKG ve NG'de ChR2-eYFP füzyon proteininin ifadesinin görüntülenmesi. A. AKG, B. AKG aksonu, C. NG.

Literatürde, MSS'de kalbi inerve eden tüm efferent nöronlar, görüntülediğimiz gibi doğrudan epikardiyal-miyokardiyal dokuya değil, kardiyak gangliyonlara projekte olur (61,70). Böylece kalp, beyin sapında lokalize olan otonom çekirdeklerden doğrudan inervasyona tabii değildir. Raporlar, MSS'nin sempatik efferentlerinin aksonlarını intratorasik ekstrakardiyak gangliyonlara yansıttığını, parasempatik efferentlerini ise aksonlarını epikardiyal yağ yastıklarında lokalize olan EpKG yansıttığını göstermiştir (Şekil 6.13 C, D), (28,67). VGLUT2-efferentlerin DMV'den kalp epikardiyumuna veya miyokardiyuma doğrudan inervasyonunu gösteren herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Ayrıca, VGLUT2-Cre trans geninin DMV nöronlarında eksprese edilmediğini bildiren çalışmalar mevcuttur (71,72,177,178). Kullandığımız VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farede 100µm'lik enine medulla spinalis ve beyin sapı kesitlerinde VGLUT2'ye bağımlı tdTomato ifadesinin varlığı araştırıldı. Beyin sapındaki çoklu çekirdeklerin pozisyonları, VGLUT2-Cre yönlendirilmiş tdTomato ekspresyonunu belirlemek için fare beyin atlasındaki aynı seviye beyin kesitlerinden belirlendi (Beyin Atlası, Allen

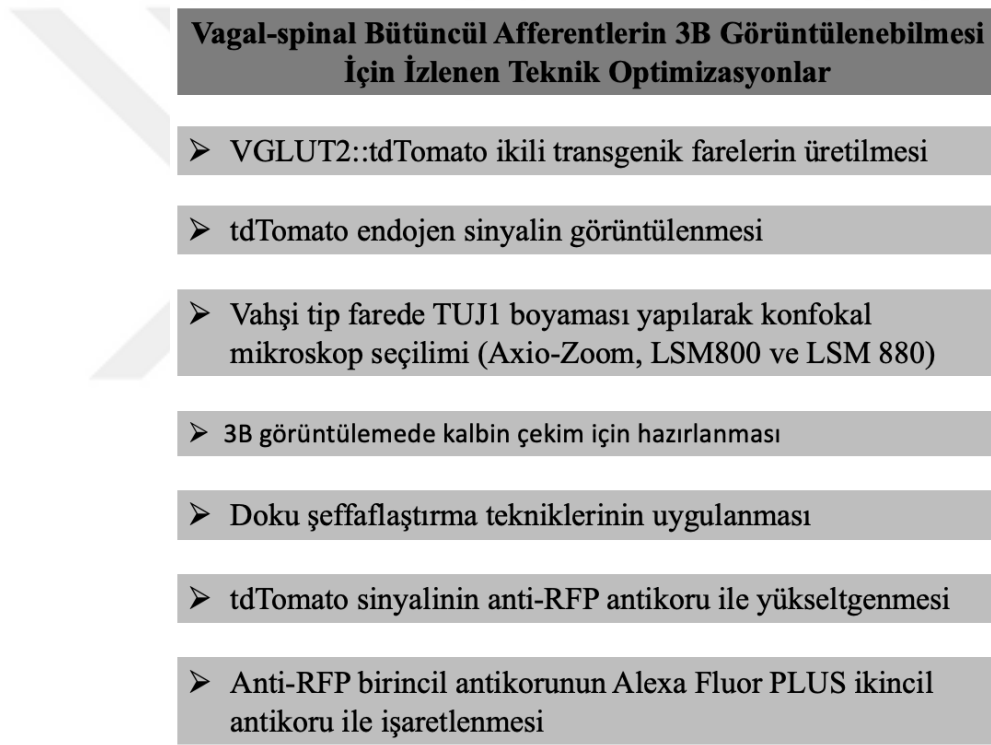
Institute for Brain Science, 2011; P56, Coronal, image 128 of 132). LSM880 konfokal mikroskopunda 5X ve 20X objektiflerle alınan görüntülerde AKG nöronal aksonlarını ifade eden dorsal boynuzdan medulla spinalise giren ve inter nöronlarla sinaps oluşturan tdTomato literatürle uyumlu olarak saptandı (Şekil 6.15 A-B) (1,149,179). VGLUT2::tdTomato transgenik soyunun beyin sapındaki DMV nöronları görüntülenerek efferentlerde VGLUT2 ifadesinin olasılığı değerlendirildi. Literatürle uyumlu olarak, verilerimiz DMV nöronlarında (Şekil 6.15 C-D) VGLUT2-raportör tdTomato ekspresyonunun olmadığını gösterdi. Bu doğrulama sonucunda kalbe dallanan VGLUT2 ifade eden akson fiberlerinin afferent kökenli olup efferent katkısının olmadığı gösterildi (90).



**Şekil 6.15** VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9 transgenik farenin omurilik ve beyin sapından alınan kesitlerin tdTomato ifadesinin görüntüleri. A. tdTomato eksprese eden AKG aksonlarının dorsal boynuzdan girdiğini gösteren omurilik kesiti. Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m. B. (A)'da gösterilen floresan sinyalinin ayrıntılı görünümü, yakınlaştırma ile ayrı olarak gösterildi. C. VGLUT2::tdTomato (kırmızı) eksprese eden nöronlar postrema alanında (Area Postrema, AP, ok başı ile) ve soliter çekirdeğinde (nucleus solitarius, ST, \* işareti ile) gözlemlendi, ancak DMV çekirdeğinin hücre gövdelerinde gözlemlenmedi. 5X objektif, Ölçek çubuğu: 500  $\mu$ m. D. (C)'deki DMV'nin ayrıntılı görünümü 20X büyütme ile elde edilmiştir. Ölçek çubuğu: 200  $\mu$ m.

### 6.3. Kalbin Afferent Ağının Görüntülenmesi İçin Optimizasyon Çalışmaları

Kalbe afferent dallanmanın global haritası elde edilirken yöntemsel optimizasyonlar yapılarak yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilmeye çalışıldı (Şekil 6.14). Doğru ekipman ve uygun işaretleme yöntemleri optimizasyonlarla tespit edildikten sonra vahşi tip ve VGLUT2::tdTomato ikili transgenik farelerin 3B görüntülenmesi gerçekleştirildi. Yüksek çözünürlükteki görüntü LSM880 konfokal mikroskopu kullanılarak endojen sinyalin anti RFP birincil antikoru ve Alexa-PLUS ikincil antikoru ile artırılması ile elde edildi.

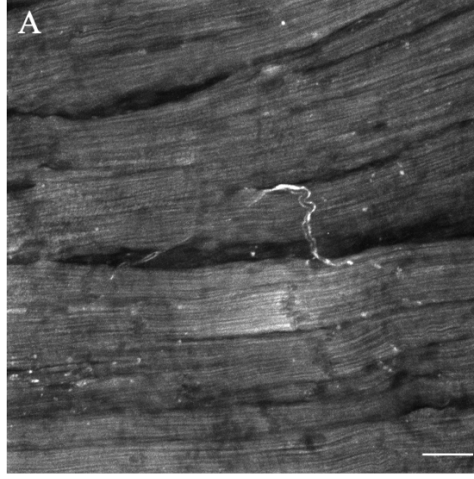


Şekil 6.16 Görüntülemeye uygulanan optimizasyonların listesi

#### 6.3.1. Kalbin afferent inervasyonunun görüntülenmesinde gerçekleştirilen optimizasyonlar

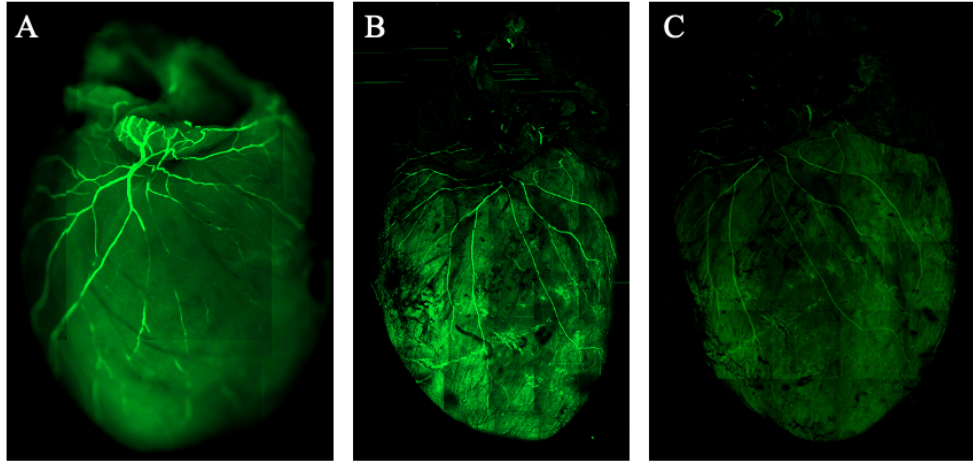
Kalbi inerve eden aksonlara ait sinyalin görüntülenmesini engelleyen kalbin arka plan otofloresanının önüne geçmek için optimal görüntüleme yöntemi belirlenmeye çalışıldı. VGLUT2::tdTomato ikili transgenik fareler heparin sonrası %4 PFA ile

perfüzyon sonrası kalpte bulunan endojen floresan ifadesi konfokal mikroskopta görüntülendiğinde yüksek arka plan otofloresanından kaynaklanan yetersiz sinyal nedeni ile global haritalamada kullanılamayacağı tespit edildi (Şekil 6.17).



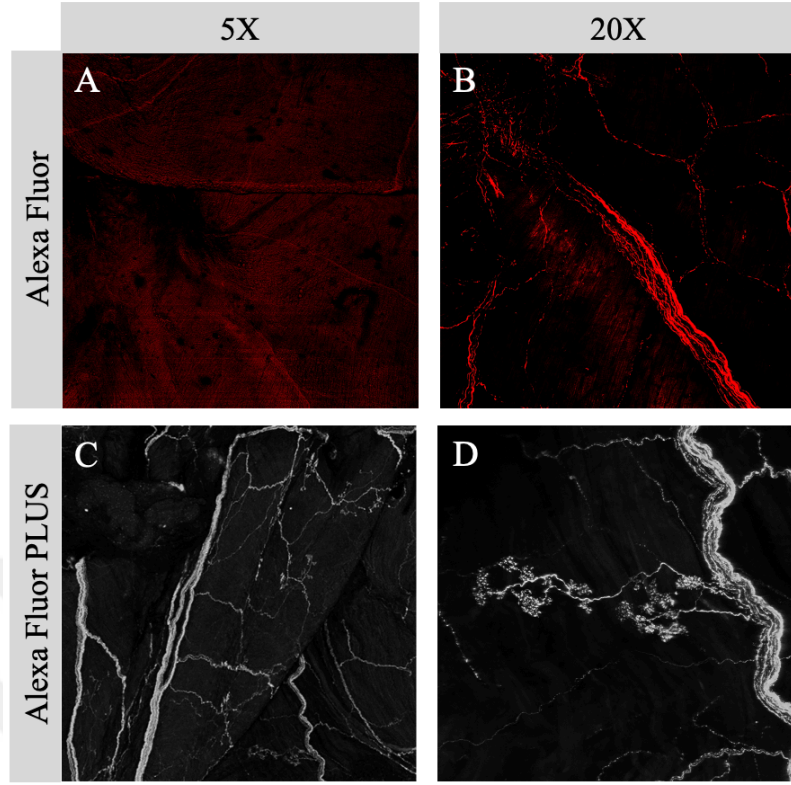
**Şekil 6.17** VGLUT2-Cre::tdTomato transgenik fare kalbinin endojen tdTomato sinyali (5x, LSM880)

Endojen sinyali artırabilmek amacıyla VGLUT2::tdTomato ikili transgenik soylarda tdTomato homozigot allelini taşıyan fare soylarının kullanımı tercih edildi. Ancak endojen sinyalin homozigot tdTomato alleleline rağmen global görüntüleme için yeterli protein ifadesi sağlamadığı görüldü. 3B haritalama görüntülerinin optimizasyonları kapsamında araştırma merkezimizde bulunan Axio Zoom mikroskobu, LSM800 ve LSM 880 konfokal mikroskopları kullanılarak uygun ekipman seçilimi gerçekleştirildi (Şekil 6.18). Axio mikroskobunda elde edilen görüntünün yeterli çözünürlükte elde edilememesi ve ikili boyamalarda kullanılacak farklı lazerleri bulundurmaması nedeni ile kullanımından vazgeçildi (Şekil 6.18 A). LSM800 çekim süresinin LSM880 konfokal mikroskobuna göre çok daha uzun olması ve LSM880'ne kıyasla elde edilen görüntünün çözünürlüğünün kötü olması nedeni ile 3B çekimlerde tercih edilmedi. Üç farklı mikroskop ile eşit lazer güçleri ile yapılan görüntüler karşılaştırıldığında LSM880 konfokal mikroskobunun airy scan modunun en hızlı çekimi (her bir yön yaklaşık 1 saat) ve yüksek çözünürlüğü verdiği gösterildi (Şekil 6.18).



**Şekil 6.18** TUJ1 birincil ve Alexa sekonder antikoruna ile immünokimyasal olarak işaretlenen aksonların 3 farklı mikroskopta 3B görüntülemesi. A. Axio Zoom B. LSM 800 C. LSM880 görüntüsü.

Uygun 3B görüntüleme yöntemi seçilirken; 1. kalpten vibrotomda 1mm'lik vertikal kesitler olarak, 2. vertikalde ortadan ikiye bölerek veya 3. ultra şeffaf agara gömüp iki taraflı çekimler gerçekleştirildi. Teknik olarak kesilen parçaların görüntülerinin birleştirilmesi, her bir parçanın görüntü datasının yüksek hacmi nedeniyle işlemsel açıdan verimli olmadı. Ek olarak endojen sinyalin global ve yakın çekimlerde yeterli görüntü eldesinde arka plan otofloresan nedeniyle yetmemesi üzerine endojen sinyal anti-RFP birincil antikoruna ile işaretlenip Alexa Fluor ve Alexa Fluor PLUS olmak üzere iki farklı ikincil antikor ile görüntülendi (Şekil 6.19). Alexa Fluor ikincil antikoruna ile boyanan kalplerden alınan görüntülerde floresan sinyalin belirgin şekilde düşük olduğu gösterildi (Şekil 6.19 A, B). İmmün floresan işaretlemelerde Alexa Fluor PLUS ikincil antikoruna ile boyanan kalplerin agara gömülmüş halde iki yönlü olarak ve LSM880 konfokal mikroskobunda airy scan modu ile gerçekleştirildi (Şekil 6.19 C, D). Ortalama olarak 6x7 kare bölmesi ve 10 µm kalınlıktan oluşan 200 adet z kesiti (z-stack) her bir yüz (dorsal, ventral) toplamda 3 mm derinlikte olacak şekilde airy scan modunda LSM880 konfokal mikroskobunda çekildi.



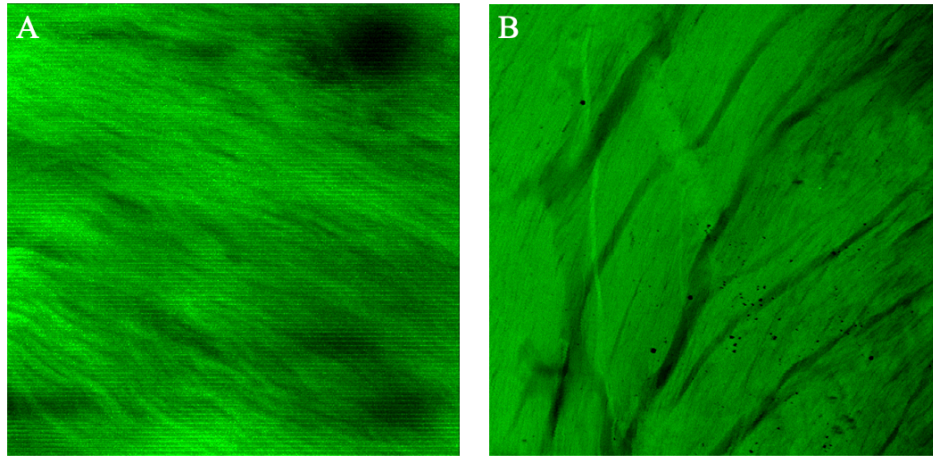
**Şekil 6.19** VGLUT2::tdTomato kalbin ventrikül yüzeyinde anti-RFP birincil antikoru ve Alexa-Fluor veya Alexa Fluor PLUS ikincil antikoru ile işaretlenen glutamaterjik akson görüntüleri. Alexa fluor ikincil antikoru kullanılan kalbin 5X (A) 20X (B) görüntüsü. Alexa fluor PLUS ikincil antikoru kullanılan kalbin 5X (C) 20X (D) görüntüsü.

### 6.3.2. Şeffaflaştırma yöntemi optimizasyonları ve görüntü derinlik analizleri

Kalbe dallanan afferentlerin kalp dokusunda epikardiyumdan miyokardiyuma doğru derinliğinin tespiti için son zamanlarda literatürde uygulanan şeffaflaştırma yöntemlerinden iDISCO, PACT ve scaleCUBIC yöntemleri kullanıldı (156,162). İlk olarak kalpte de denenilen iDISCO protokolü kalbin pan-nöronal belirteç olan Tuj1 antikoru ile immünokimyasal boyaması gerçekleştirilerek uygulandı (28,158). Şeffaflaştırma öncesi aldığımız görüntülere kıyasla iDISCO yöntemi ile şeffaflaştırma sonrasında kalbin miyofibril ve proteince zengin yapısından kaynaklı arka planda (background) otofloresan sinyali nedeniyle Tuj1 proteinine yönelik immün işaretli sinyalleri ayırt etmekte zorlandık (Şekil 6.20). Optimizasyon çalışmalarımız kapsamında metanol ya da tetrahydrofulan ile organları dehidre edip dibenzil eter veya



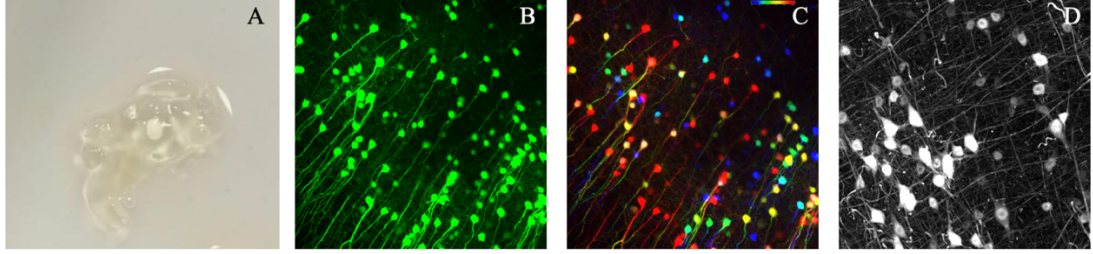
benzilalkol-benzil-benzeoat karışımı kullanarak lipit moleküllerini çözerek uzaklaştırılması yöntemi ile yapılan ön işleme dayanan iDISCO protokolü ve bu protokolden revize edilmiş ön işlem yapılmadan denediğimiz farklı protokoller fare kalbinde uygulandı (28,158) (Şekil 6.20 A, B). Bu yöntemler kapsamında uygulanan farklı kimyasallar ile arka plan sinyalin azalmadığı gibi kalpteki sinir ağından gelen antikör kaynaklı sinyalin solduğunu LSM880 konfokal mikroskobu ile çekilen farklı büyütmelelerdeki görüntülerde tespit ettik (Şekil 6.20 A, B).



**Şekil 6.20** iDISCO yöntemi ile şeffaflaştırılan kalbin miyokard görüntüsü. Ön işlem sonrası (A) ve ön işlem yapılmadan (B) anti-TUJ1 ile immüno işaretleme ve şeffaflaştırma sonrası çekilen kalp görüntüsü (20X) (LSM880).

iDISCO ile şeffaflaştırma yöntemi sonucunda artan arka plan sinyali nedeni ile floresan sinyalin yüksek çözünürlükte elde edilememesi sonucunda 3B görüntüleme ve detaylı 20X yakın çekimlerde derinlik bilgisi miyokardın tamamını alacak kadar elde edilemedi. PACT yöntemi ile şeffaflaştırma işleminde nitrojen gazı ile yapılan gaz uzaklaştırma aşamasının yeterli şekilde yapılamaması nedeni ile polimerleşmenin sağlanmasında sıkıntılar yaşandı. Yapılan optimizasyonlardan sonra elde edilen polimerleşme sonrasında %8 SDS içeren solüsyonda kalbin şeffaflaşmadığı görüldü. Bu nedenle son zamanlarda sıklıkla kullanılan hidrofilik yöntem olan CUBIC ve türevleri (Scale, scaleCUBIC gibi) beyin dokusunda optimizasyon çalışmalarında denendi. Endojen olarak sinir hücrelerinde EGFP floresan proteinini ifade eden Thy1-EGFP (Jaxlab #007788) transgenik fare soyunun beyni disekte edilip scaleCUBIC-1

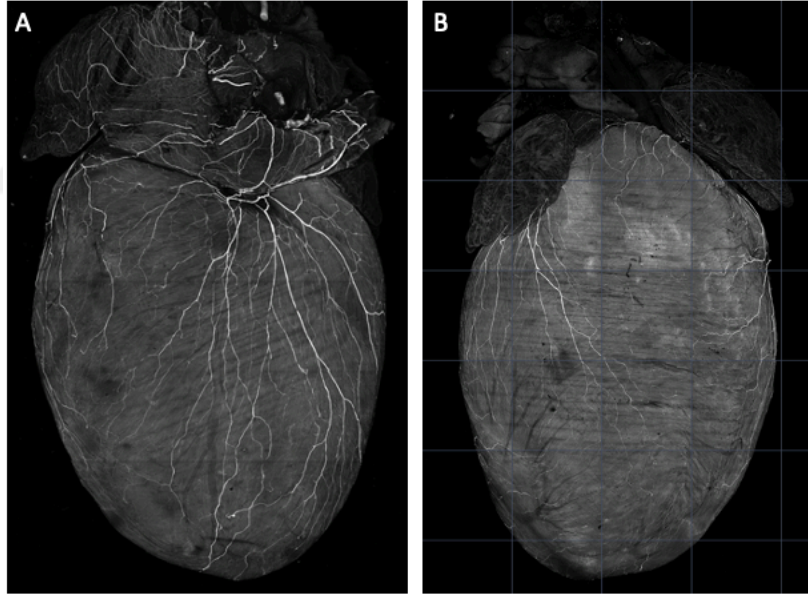
solüsyonu ile uzun süreli muamele edildi. Yapılan çalışmada 1 hafta sonra beynin tamamen şeffaflaştığı (Şekil 6.21 A) ve görüntülemeye derinlik kazanıldığı görüldü (Şekil 6.21 B, C). 6 hafta ve iki ay sonra yapılan görüntülemeye endojen floresan sinyal tespit edildi (Şekil 6.21 D).



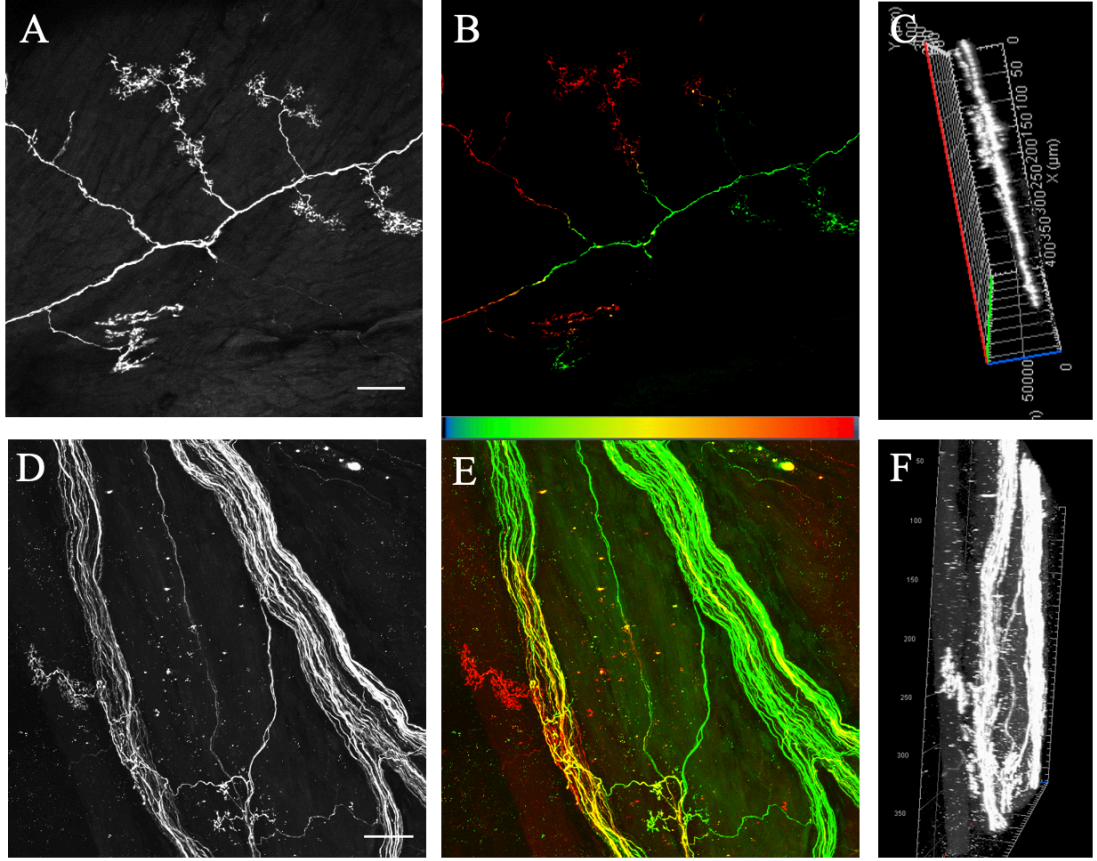
**Şekil 6.21.** THY1-EGFP transgenik fare beyninin şeffaflaştırma sonrası görüntüsü. scaleCUBIC uygulamasından 1 hafta sonrasında beynin gün ışığı altında görüntüsü (A), 10X objektifte konfokal görüntüsü (B) ve B'deki görüntünün renk kodu ile yapılan derinlik analizi görüntüsü (kırmızı yüzeyi, mavi-mor renk ise daha derin bölgedeki hücre gövde ve aksonlarını gösteriyor). C. scaleCUBIC uygulamasından 6 hafta sonrasında 10X objektifte yakınlaştırma kullanılarak çekilen beyin görüntüsü.

Beyin kesitleri, AKG ve kalp dokusunda yapılan denemelerde THY1-EGFP beyninde elde edilen şeffaflaştırma ve görüntüleme derecesi gerçekleşmedi. Beyin dokusunun yoğun lipid içeriği, kalp dokusunun ise proteince zengin kas yapısı yapısında oluşu berraklaştırmada kullanılan kimyasalların farklı dokularda farklı sonuçlar doğurabileceğini gösterdi. Farklı doku yapılarına sahip olmalarının dışında endojen floresan proteinin ifadesinin de farklı oluşu nedeni ile THY1-EGFP, VGLUT2-Cre::tdTomato ve VGLUT2-Cre::ChR2EYFP gibi farklı endojen floresan proteinleri bulunan transgenik fareler seçildi. Berraklaştırmada kullanılan kimyasalların endojen proteinlere etkisinin farklı olabileceği sorusuna cevap bulmak için; farklı transgenik farelerden disekte edilen beyin ve kalp dokularında da benzer işlemler uygulandı. tdTomato ve EYFP floresan proteinlerini endojen olarak ifade eden kalplerde oto floresanın artması nedeni ile endojen sinyal belirlenemedi. Ayrıca kalpte endojen floresan sinyali dışında anti-TUJ1 antikoru ile immünokimyasal boyama sonrası yapılan şeffaflaştırmada da kalbin kas kökenli arka plan sinyalinin artması nedeni ile spesifik sinyalin belirlenememesinden 3B görüntü ile birlikte derinlik bilgisi elde edilemedi (Şekil 6.22). 3B tüm kalp çekimlerinde karşılaşılan arka

plan yüksekliği nedeni ile derinlik analizi 20X objektif ile yapılan çekimlerle elde edildi. VGLUT2-Cre::tdTomato transgenik fare kalplerinin tdTomato sinyali anti-RFP birincil antikoru ve Alexa Fluor PLUS ikinci antikoru ile arttırıldı. İmmünokimyasal işaretlemeyi takiben scaleCUBIC ile şeffaflaştırma işlemi uygulanmayan kalplere oranla (Şekil 6.23 A, B, C) scaleCUBIC-1 solüsyonu uygulaması sonrası yapılan görüntülemelerde yaklaşık 200-300 µm derinlik bilgisi sağlandı (Şekil 6.23 D, E, F). Ayrıca sinir fiberlerinin yapı ve kalbe dallanmalarının şeffaflaştırma sonrası elde edilen görüntülerde daha detaylı olduğu görüldü. Z-kesit çekimi yapılan kalp bölgelerinin analizi ile şeffaflaştırılmış epikardiyumdaki fiber dallanması derinlik bilgisi ile birlikte gösterildi (Şekil 6.23 B E). Z-kesit görüntülerinin 3B görüntülemesinin CUBIC uygulanmış ve uygulanmamış kalplerde yapılan karşılaştırmalı analizinde şeffaflaştırma sonrası enine derinliğin yaklaşık 200 µm olduğu tespit edildi (Şekil 6.23 C F).



**Şekil 6.22** CUBIC şeffaflaştırma yöntemi sonrası vahşi tip anti-TUJ1 boyalı kalbin 5X global görüntüsü. A. Kalbin dorsal ve B. Ventral yön görüntüsü.



**Şekil 6.23** VGLUT2::tdTomato ikili transgenik fare kalbinin anti-RFP birincil ve anti-488 Alexa Plus ikincil antikorları ile yapılan immüno boyamayı takiben ventrikül bölgesinde direkt ve şeffaştırma uygulaması sonrası görüntüler. A. İmmünokimyasal boyama sonrası 20X görüntüsü, B. Yüzeiden (yeşil) derine (kırmızı) doğru ilerleyen fiberlerin derinlik bilgisinin renk kodu ile gösterimi ve C. 3B'lu enine görüntü. D. İmmünokimyasal boyamanın ardından şeffaştırma sonrası 20X görüntüsü, E. renk kodu ile derinlik bilgisi ve F. 3B'lu enine görüntü.

#### 6.4. Kalbin 3B Efferent ve Afferent İnervasyonunun Vahşi Tip ve Transgenik Fare Soylarında Haritalanması

Transgenik fare yaklaşımı ve immüno boyama tekniklerinin bütünsel yaklaşımı ile kalbin afferent inervasyonu yüksek çözünürlükte 3B olarak görüntülendi. Ayrıca vahşi tip fareler kullanılarak sempatik inervasyon ve kalbin genel inervasyon haritası immüno boyama tekniği sonrası LSM 880 konfokal mikroskopunda oluşturuldu. Kalbin sağlıklı ve MI sonrası sinir ağının duyuşal komponenti ve afferent-efferent ayrımı literatürde eksik kalan bir alandır. MI sonrası aritmi oluşumunun mekanizmasının detaylı anlaşılması ve tedavi seçeneklerinin oluşturulabilmesi amacı

ile ilk olarak sağlıklı kalpte daha sonra MI kalpte global haritalama tez çalışması kapsamında yapılmıştır. Yayınlanan çalışmalarda transgenik fare soyu kullanımı ve immünokimyasal boyamalar sonrası elde edilen görüntülerin yeterli detay verememesi bu eksikliği göstermektedir. Bu tez çalışmasında anti-TUJ1 antikoru ile bütün inervasyonu görüntülemek amaçlanmışken, anti-TH antikoru ile sempatik efferentler ve anti-RFP antikoru ile Cre bağımlı tdTomato sinyalinin artırılarak VGLUT2 ifade eden afferentlerin haritalanması planlanmıştır.

#### **6.4.1. Kalbin afferent inervasyonunun transgenik fare soyları kullanılarak haritalanması**

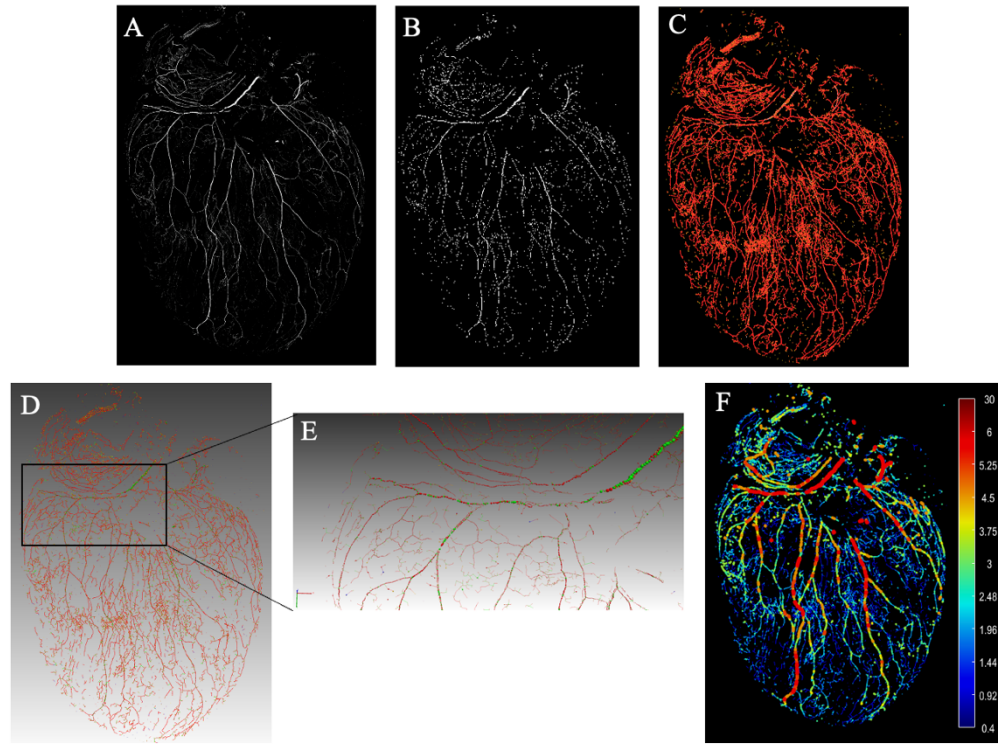
Kalbe dallanan AKG ve NG kökenli afferentlerin görüntülenmesinde VGLUT2-Cre transgenik fare soyu kullanılırken AKG kökenli afferentlerin görüntülenmesinde ticari olarak temin edilip doğrulamalar sonrası kullanılan Pvalb-cre, Mrgprd- cre ve VGLUT3-Cre transgenik fare soyları kullanılmıştır. Afferentlerin haritalanması amacı ile bütün transgenik fare soyları loxP-tdTomato transgenik fare ile çaprazlandıktan sonra elde edilen ikili transgenik soylardan perfüzyon sonrası disekte edilen kalpler immünokimyasal olarak anti-RFP birincil antikoru ve sonrasında anti-Alexa-PLUS-488 / 647 ikincil antikoları ile boyandı. Görüntüleme kalplerin %0.2'lik saf agaroz dorsal ve ventral olarak gömülmesi sonrası LSM880 konfokal mikroskobunda airy scan modu kullanılarak gerçekleştirildi. Z-kesit ve karelerden oluşan 3B çekimler tamamlandıktan sonra görüntüler Zen Blue programında airy scan işleme, maksimum projeksiyon ve karelerin birleştirilmesi metotları uygulanarak işlenip hazırlandı.

##### **6.4.1.1. Akson çapı ve aksonal dağılım analizleri**

NeuTube 1.0 programı kullanılarak airy scan işlemi, maksimum projeksiyon ve kare birleştirme sonrası oluşturulan 2B görsel ilk aşamada binarize (sinyallerin ikilileştirilmesi, siyah arka plan ve beyaz pikseller) edildiler (Şekil 6.24 A, B) (28). Floresan sinyalleri ifade eden beyaz pikselleri birleştirerek sinir eğrilerinin iskeleti oluşturuldu (Şekil 6.24 C). Oluşturulan sinir iskeletinden akson çaplarının belirlenmesi ise değişen kalınlıkları farklı çapta küreler şeklinde gösterimi ile elde edilen görüntü kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 6.24 D, E). Son olarak programdan renk skalasına göre kalından inceye göre nöron fiberlerinin haritası elde edildi (Şekil

6.24 F). Sağlıklı ve MI sonrası görüntü analizlerinde Şekil 6.24 de belirtilen işlemler yapılarak analizler gerçekleştirildi. Afferent sinir liflerini tespit etmek ve daha önce açıklandığı gibi kalbin hem dorsal hem de ventral taraflarındaki çaplarını ölçmek için nöral izleme (neural tracing) algoritması kullanıldı (28).

Sağlıklı kalplerde dorsal ventral yönde akson dağılım karşılaştırması binarize edilen görüntülerde yapılan alan başına düşen piksel miktarı hesaplaması ile gerçekleştirildi.

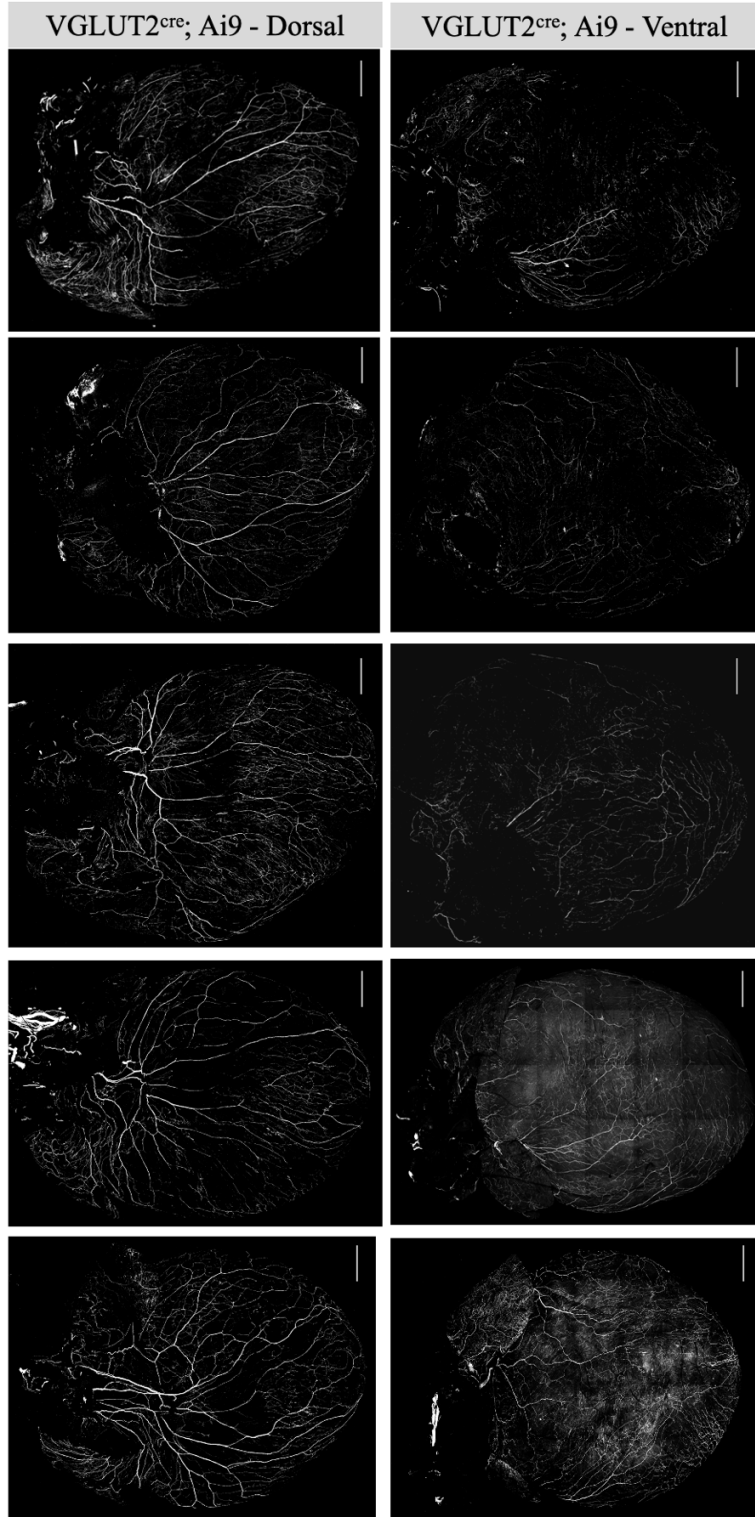


**Şekil 6.24** NeuTube 1.0 programı ile görüntü analizi A. Kalbin dorsal yönüne ait 2B görüntüsü. B. Görüntünün binarize edilmiş hali C. Sinir iskeletinin oluşturulması D. Akson çapına göre farklı çaplarda kürelerle gösterim ve E. yakın gösterimi. F. Akson çap analizinin renk skalasına göre gösterimi.

#### 6.4.1.2. *VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9* ikili transgenik fare kullanılarak AKG ve NG kökenli afferent inervasyonunun haritalanması

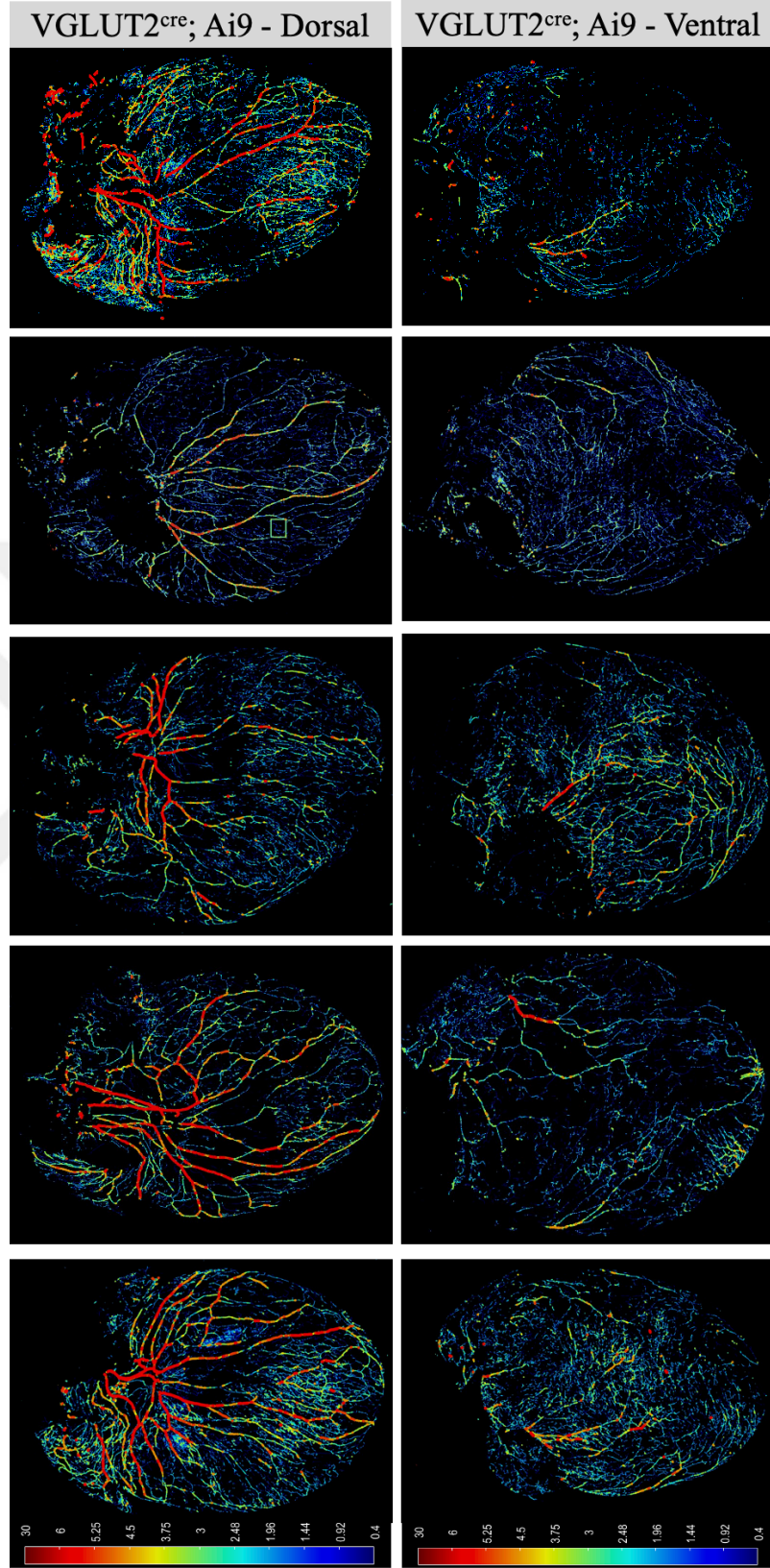
Kalbin tüm organ seviyesinde duyuşal kardiyak inervasyonunun haritalanması amacı ile *VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9* transgenik fare kalpleri immünokimyasal yöntemlerle görüntülenmek üzere boyandı. İlk olarak, kalbin hem dorsal hem de ventral

tarafındaki spinal ve vagal afferent yoğunluğu, projeksiyonlar ve aksonal uçlar, RFP-IR ile tdTomato sinyalinin yoğunluğu artırılarak haritalandı (n: 5, Şekil 6.25). Sinyal artırma işlemi anti-RFP birincil antikoru ve anti-Rabbit Alexa-PLUS-647 ikincil antikoru ile yapıldı. Ancak yapılan immüno-işaretleme yönteminde yöntem ve süreler eşit olmasına rağmen bazı kalplerin arka plan görüntülerinin daha yoğun olduğu görüldü. Optimizasyonlar sonrasında beş farklı VGLUT2-Cre::tdTomato transgenik fare kalbine ait dorsal ve ventral görüntüleri incelendi (Şekil 6.25). Ventral taraftaki arka plan kalp kasından kaynaklanan oto floresan nedeniyle antikor ile sinyalin arttırılmasına rağmen dorsal kısma oranla daha az sinyal elde edildi (Şekil 6.25). 2B görüntülerden NeuTube1.0 programı ile elde edilen akson çapı analiz görüntüleri akson yoğunluğunun ve kalınlıklarına göre dağılımlarının analizlerinde kullanıldı (Şekil 6.26).



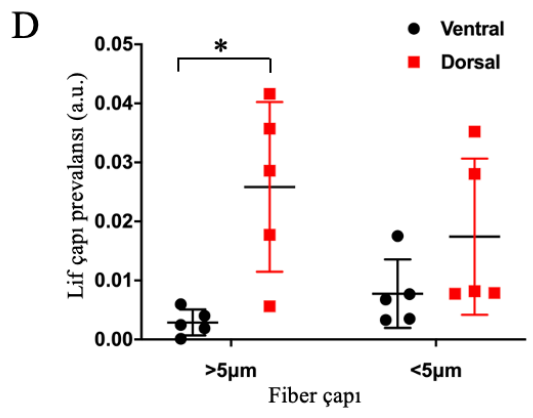
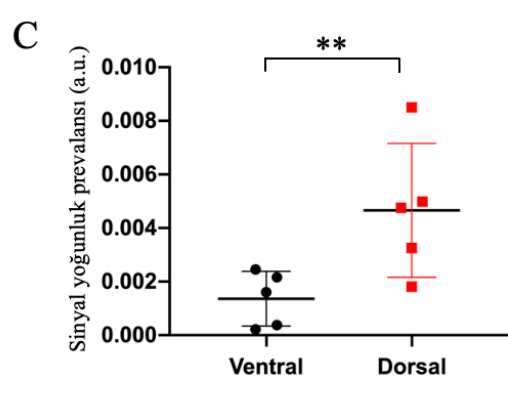
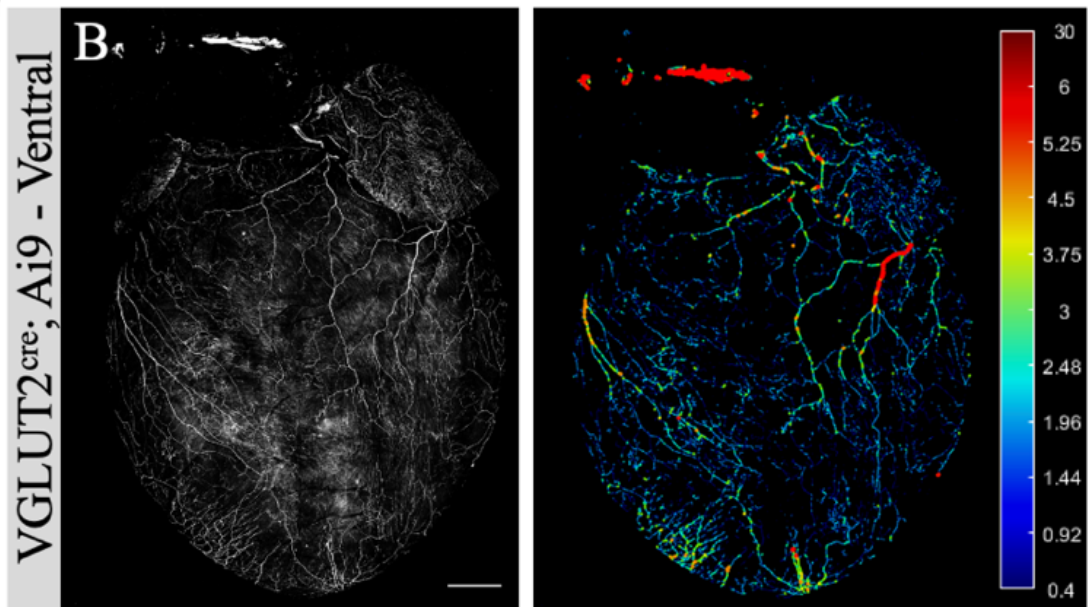
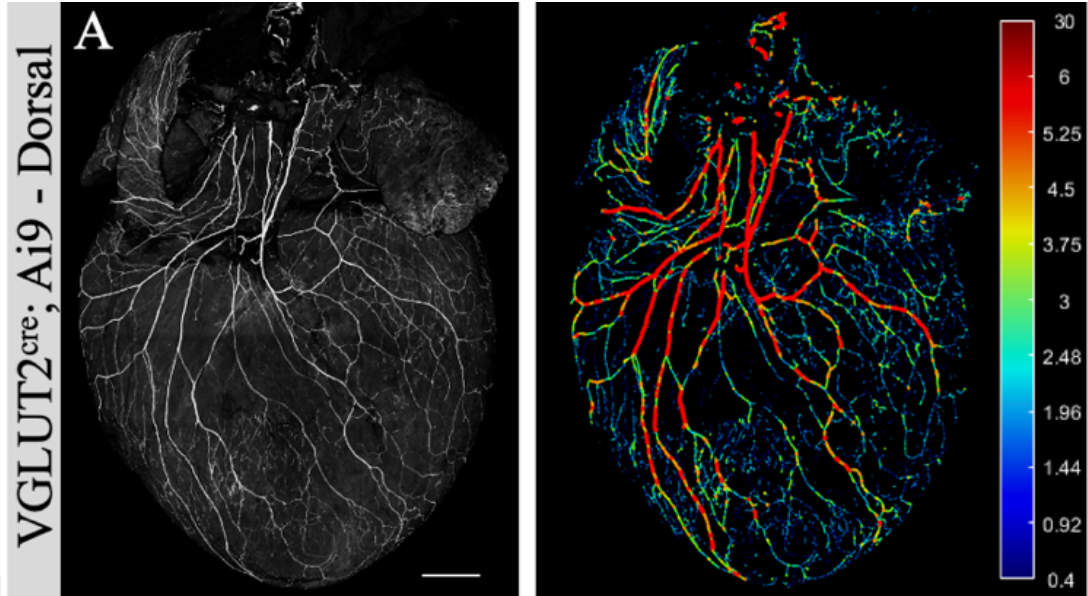
**Şekil 6.25** VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik farelere ait kalplerin tdTomato endojen floresan sinyalinin immünokimyasal yöntemle artırılarak dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) yüzlerinin 5X büyütmede maksimum projeksiyon görüntüleri





**Şekil 6.26** VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transjenik farelere ait kalplerin dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) görüntülerinin akson çapı analiz görüntüleri.

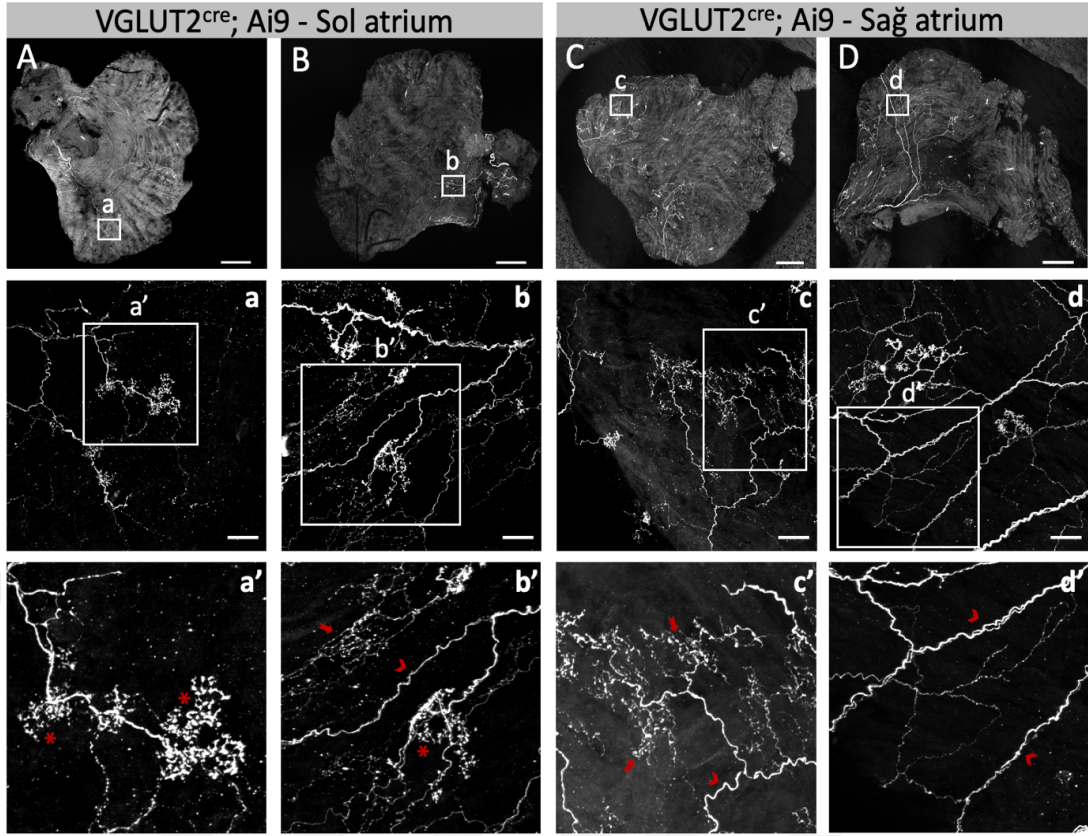
Ventral yüze kıyasla kalbin dorsal yüzünde (Şekil 6.27 A) daha yoğun duyu sinir lif ağı gözlemlendi (Şekil 6.27 B). Duyu sinirlerini işaretleyen tdTomato sinyal yoğunluğu dorsal yüzde ventral yüze oranla anlamlı şekilde daha yüksek olarak belirlendi ( $p=0,004$ , t-testi) (Şekil 6.27 C). Literatürdeki çalışmalar, kardiyak inervasyonunun kalp hilumundan başladığını ve önceki raporlarla tutarlı olarak ventrikül ve apekse kadar ilerlediğini göstermektedir (107,180). Atriyo ventriküler olukta büyük çaplı ( $>5\mu\text{m}$  ile  $\sim 30\mu\text{m}$ ) afferent lifler bulunurken, ventriküllerden apekse doğru daha küçük çaplı lifler ( $\sim 5\mu\text{m}$  ile  $\sim 0.4\mu\text{m}$ ) tespit edildi (Şekil 6.27 A sağ panel). Yapılan sinyal yoğunluk analizine göre, VGLUT2 eksprese eden duyu sinir afferentlerin, kalbin dorsal yüzünde ventral yüze göre önemli ölçüde daha yoğun olarak inervasyonu olduğu tespit edildi (ttest,  $p:0,004$ , Şekil 6.27 A, B, C). Ayrıca, VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik farenin kalbinin ventral yüzünün görüntülerinin analizi sonucunda  $>\sim 5\mu\text{m}$ 'den daha büyük liflerin prevalansının dorsal yüze kıyasla anlamlı şekilde daha az olduğu gösterildi (ttest,  $p:0.01$ , Şekil 6.26, 6.27 B sağ panel, 6.27 D).



**Şekil 6.27** VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9 transgenik kalbinde kardiyak duysal inervasyonun 3B gösterimi. Kalbin dorsal (A) ve ventral (B) yüzlerinin 5X büyütmede maksimum projeksiyon görüntüleri (solda) ve sinir çapı ölçümleri için türetilmiş renk kodlu harita (sağda). C. Kalplerin dorsal ve ventral yüzleri arasındaki sinir yoğunluklarının ölçümü (p=0,004, t-testi), n=4. D. Çapları > 5µM ve < 5µM olan kalplerin dorsal ve ventral yüzündeki sinir liflerinin prevalanslarının niceliği (p=0.01, t-testi), (\*:p< 0.05, \*\*:p< 0.01) n = 4. Ölçek barı: 1 mm.

### **6.5. Atriyum ve Ventriküllerdeki Kardiyak Afferent Ağ ve Sinir Ucu Morfolojilerinin Detaylı Değerlendirilmesi**

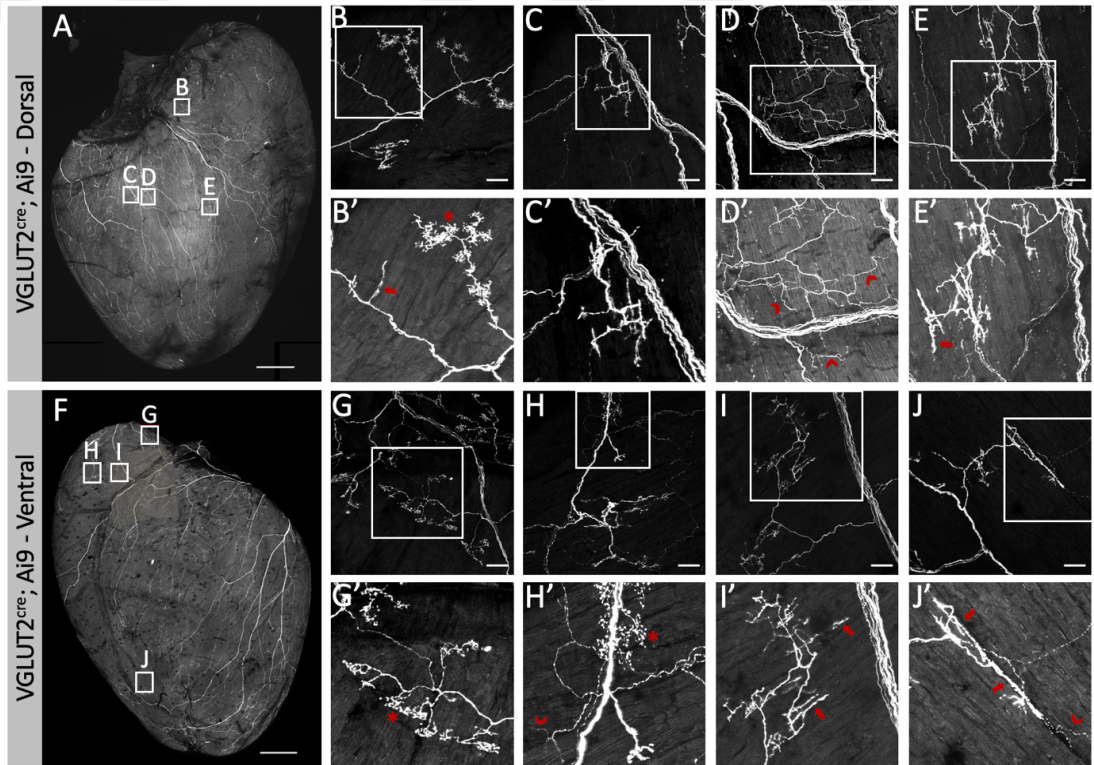
VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik farenin kalbindeki tdTomato sinyali, anti-RFP immüno-işaretleme yöntemi ile güçlendirilerek özellikle atriyum ve ventriküllerdeki hem tüm doku boyutunda duysal inervasyonun değerlendirilmesi hem de sinir ucu morfolojilerinin görselleştirilmesi sağlandı. Global görüntüleme için 5X objektif ile kalbin dorsal ve ventral yönünün agara gömülmesi ile gerçekleştirildi. 3B çekimin ardından atriyumlar bistüri yardımı ile kalpten ayrıldı ve her bir atriyum iki farklı yönde görüntülenmek üzere cam plaka üzerine alındı. Global görüntüleri 5X objektif ile gerçekleştirilen atriyumlar üzerindeki sonlanmaların detaylı çekimi için 20X objektif kullanıldı (Şekil 6.28). Sol (Şekil 6.28 A) ve sağ atriyumun üst yüzeyinin (Şekil 6.28 C) yanı sıra sol (Şekil 6.28 B) ve sağ (Şekil 6.28 D) atriyumun ventriküle bakan yüzeylerinin görünümü detaylı çekimler ile değerlendirildi. Her iki atriyumda çiçek benzeri sonlanmalar (flower spray endings) (Şekil 6.28 a, a', b'), dallanma tipi uç sonlanmaları (branching type end-net meshes) (Şekil 6.28 b, b', c, c') ve ayrıca tek akson dalları (single axon branches) (Şekil 6.28 d, d') gözlemlendi. Ayrıca dalgalı yapılarla sahip sinir lifleri atriyumda dağınık şekilde görüntülendi (Şekil 6.28 b', c', d' ve 6.28 J, J'). Duyusal inervasyon ve atriyumda farklı sinir ucu morfolojileri doku boyunca herhangi bir bölgesel yoğunluk olmaksızın tespit edildi. Gözlemlenen sonlanma türleri, çiçek benzeri sonlanmalar (18,26,181) ve uç ağlar (end-nets) literatürle tutarlıydı (15).



**Şekil 6.28** Atriyumlardaki afferentlerin ve sinir uçlarının ayrıntılı karakterizasyonu. Sol atriyumun üstten görünümü (A), işaretli alanın yüksek büyütmede (a) gösterildi. (a)'da gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü, (a)'da ayrıca gösterilmiştir. Sol atriyumun (B) ventriküle bakan yüzeyi daha yüksek büyütmede (b) gösterildi. (b)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü, (b)'de ayrıca gösterilmiştir. Sağ atriyumun üstten görünümü (C) daha yüksek büyütmede (c) gösterildi. (c)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü, (c)'de ayrıca gösterilmiştir. Sol atriyumun (D) ventriküle bakan yüzeyi daha yüksek büyütmede (d) gösterildi. (d)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü (d)'de ayrıca gösterilmiştir. Dallanma tipi uç ağları oklarla, çiçek sprej uçları yıldızlarla (\*) ve dalgalı lifler ok uçları ile gösterilmiştir. A, B, C ve D, 500 µm'lik ölçek barları ile 5X büyütme ile alınmıştır. a, b, c ve d, 50 µm'lik ölçek barları ile 20X büyütme ile alınmıştır.

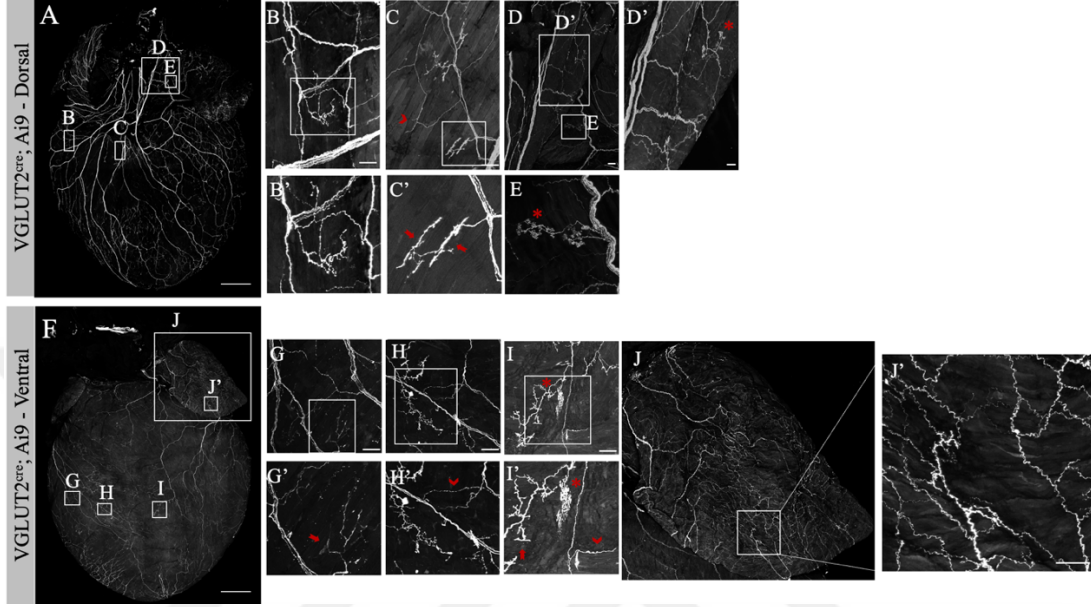
Atriyumların detaylı görüntülenmesi sonrasında, farelerin kalbinin hem dorsal hem de ventral yüzlerinde ventriküllerdeki ayrıntılı duyuşal sonlanma tipleri incelendi (Şekil 6.29, 6.30). Çiçek benzeri sinir uçları (Şekil 6.29 B, G, H ve 6.30 E, I) ve tek akson dalları (Şekil 6.29 D, H, J ve 6.30 C, H', I') ventriküllerin üst ve apeks kısımları dahil olmak üzere kalbin her iki yönünde de tespit edildi. Miyokardiyumun otofloresan özelliği kullanarak, ventriküllerdeki kalp kası lifleri ile hizalanan kas içi dizi sinir

uçları (intramuscular array) gösterildi (Şekil 6.29 C, E, I, J ve 6.30 C, G, I). Kalp boyunca hem atriyumda (Şekil 6.26) hem de ventriküllerde (Şekil 6.29, 6.30) serbest tek akson sinir uçları ve çiçek benzeri sonlanmalar gözlenmesine rağmen, ventriküllerde atriyum ile karşılaştırıldığında dallanmış uç ağlar daha az ve kas içi dizi sinir uçları daha fazla gözlemlendi. VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik farelerin kalplerinde endojen tdTomato sinyalinin anti RFP antikoru ile artırılması sonucu yapılan görüntülemelerde bütün kalplerde benzer şekilde atriyumlarda dalgalı yapıda fiberler yoğun olarak görüntülenirken kas içi sonlanmalar ventrikül özelinde görüntülendi (Şekil 6.29 ve 6.30). Özellikle çiçek benzeri sonlanmaların literatür benzeri koroner arter yüzeyinde de olduğu gösterildi (Şekil 6.30 D, D' ve E).



**Şekil 6.29** Ventriküllerdeki duysal liflerin ve sinir uçlarının ayrıntılı karakterizasyonu. A. VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 farenin tüm ventrikülünün dorsal yüzünün 5X büyütmede görüntülenmesi. (A)'da işaretlenmiş alanların detaylı görünümü (B), (C), (D) ve (E)'de ayrı ayrı 20X büyütmede gösterilmiştir. (B), (C), (D) ve (E)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü sırasıyla (B'), (C'), (D') ve (E')'de ayrı ayrı gösterilmiştir. F. VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik farenin tüm ventrikülünün ventral yüzünün 5X büyütmede görüntülenmesi. (F) ile gösterilen inervasyonun detaylı görünümü (G), (H), (I) ve (J)'de ayrı ayrı 20X büyütmede gösterilmiştir. (G), (H), (I) ve (J)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü, sırasıyla (G'), (H'), (I') ve (J')'de ayrı ayrı gösterilmiştir. tdTomato proteininden gelen floresan sinyali, tüm dokuda anti-

RFP immüno-etiketleme ile güçlendirildi. Kas içi sinir uçları oklarla gösterilmiştir. Çiçek benzeri sinir sonlanmaları (\*) ve akson dallanmaları ok başlarıyla gösterilmiştir. Ölçek barları: (A) ve (F) için 1 mm. Ölçek barları: 50  $\mu$ m (B-E) ve (G-J).



**Şekil 6.30** Kalpteki duysal liflerin ve sinir uçlarının ayrıntılı karakterizasyonu A. VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 farenin kalbinin dorsal yüzünün 5X büyütmede görüntülenmesi. (A)'da işaretlenmiş alanların detaylı görünümü (B), (C) ve (E) 20X büyütmede, (D) 5X ve (D)'de 10X büyütmede gösterilmiştir. (B), (C), (D) ve (E)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü sırasıyla (B'), (C'), (D') ve (E)'de ayrı ayrı gösterilmiştir. F. VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik farenin kalbinin ventral yüzünün 5X büyütmede görüntülenmesi. (F) ile gösterilen inervasyonun detaylı görünümü (G), (H), (I) ve (J)'de ayrı ayrı 20X büyütmede gösterilmiştir. (G), (H), (I) ve (J)'de gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü, sırasıyla (G'), (H'), (I') ve (J)'de ayrı ayrı gösterilmiştir. tdTomato proteininden gelen floresan sinyali, tüm dokuda anti-RFP immüno-etiketleme ile güçlendirildi. Kas içi sinir uçları oklarla gösterilmiştir. Çiçek benzeri sinir sonlanmaları (\*) ve tek akson dalları ok başlarıyla gösterilmiştir. Ölçek barları: (A) ve (F) için 1 mm. Ölçek barları: 50  $\mu$ m (B-E) ve (G-I ve J').

## 6.6. Kalbin Genel, Sempatik ve Duyusal İnervasyonunun Görüntülenmesi

Kalbin genel inervasyonundan sempatik ve duysal inervasyonun ayırt edilebilmesi için vahşi tip ve ikili transgenik fare kalplerinde tekli ve ikili immün boyamalar gerçekleştirildi. 3B haritalamada afferent ve sempatik inervasyon modelinin görüntülenmesi transgenik ve immün boyama yöntemlerinin birlikte

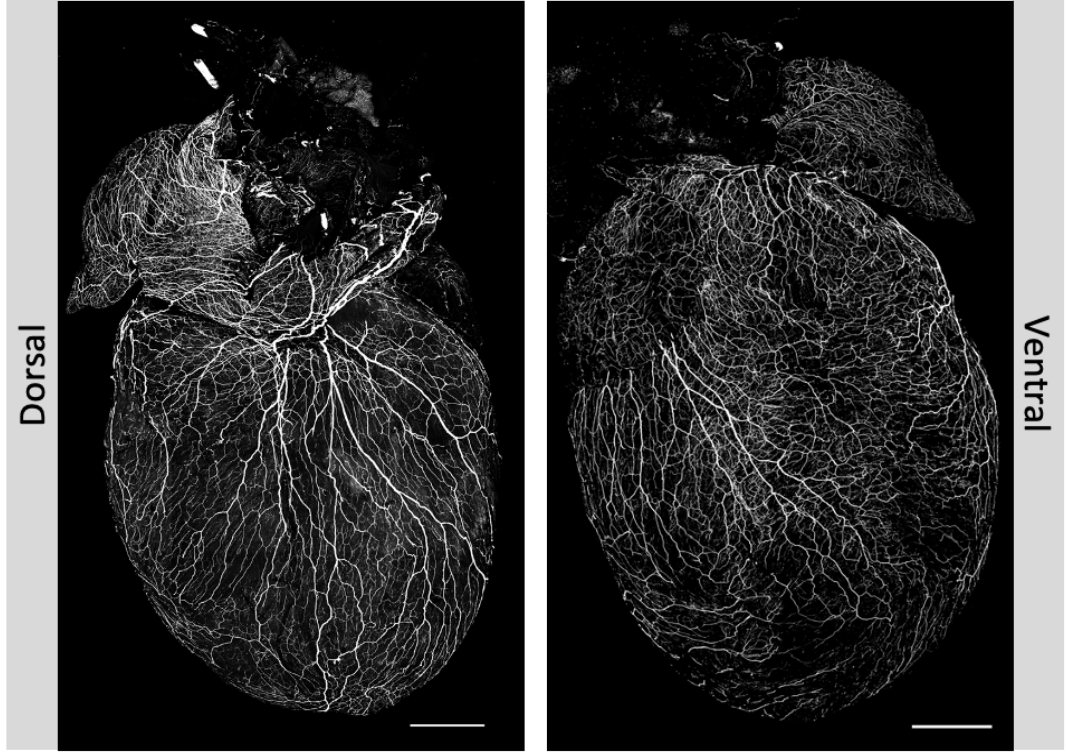
kullanımı ile gerçekleştirildi. Kalbin genel ve sempatik inervasyonu vahşi tip fare kalplerinde tek antikor ile ve afferentlerin ayrımı için iki antikor ile immün boyama gerçekleştirdi. Tekli boyamadan farklı olarak iki antikor kullanılan kalplerde antikorlar ayrı zamanlarda aralarda yıkamalar yapılarak eklendiler. Birlikte eklenen birincil antikorlar ve sonrasında ikincil antikorlar ile yapılan immüno işaretlenen kalplerinin görüntülerinde floresan sinyallerin birbirinden ayrılacak kadar yeterli olmadığı görüldü. Floresan sinyallerinin net ayrımının gerçekleşebilmesi adına birincil antikorlardan birine 488  $\lambda$  içeren diğerine ise 647  $\lambda$  ikincil antikor kullanıldı. Özellikle farede üretilen antikorların kullanımından ciddi arka plan sinyali oluşturması nedeni ile kaçınıldı. Bu amaçla ikili boyamalarda genellikle donkey-anti-goat-Alexa fluor PLUS-488 ve donkey-anti-rabbit-Alexa fluor PLUS-647 kullanıldı. Kardiyak glutamaterjik afferent inervasyonun dağılımını ve lokalizasyonunu global kardiyak inervasyon modeli ve sempatik efferent fiberler ile karşılaştırmalı olarak araştırmak için ilk olarak vahşi tip farelerin kalpleri Pan-nöronal marker TUJ1 proteini (Şekil 6.31, 6.32) ve sempatik efferent spesifik marker olan anti-TH antikorunu ile immünokimyasal yöntemle boyandı (Şekil 6.33).

#### **6.6.1. Kalbin TUJ1 pozitif fiber genel inervasyonunun haritalanması**

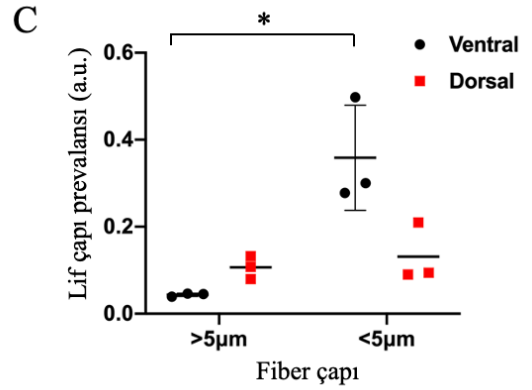
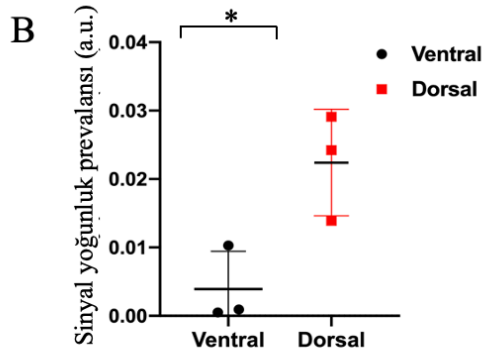
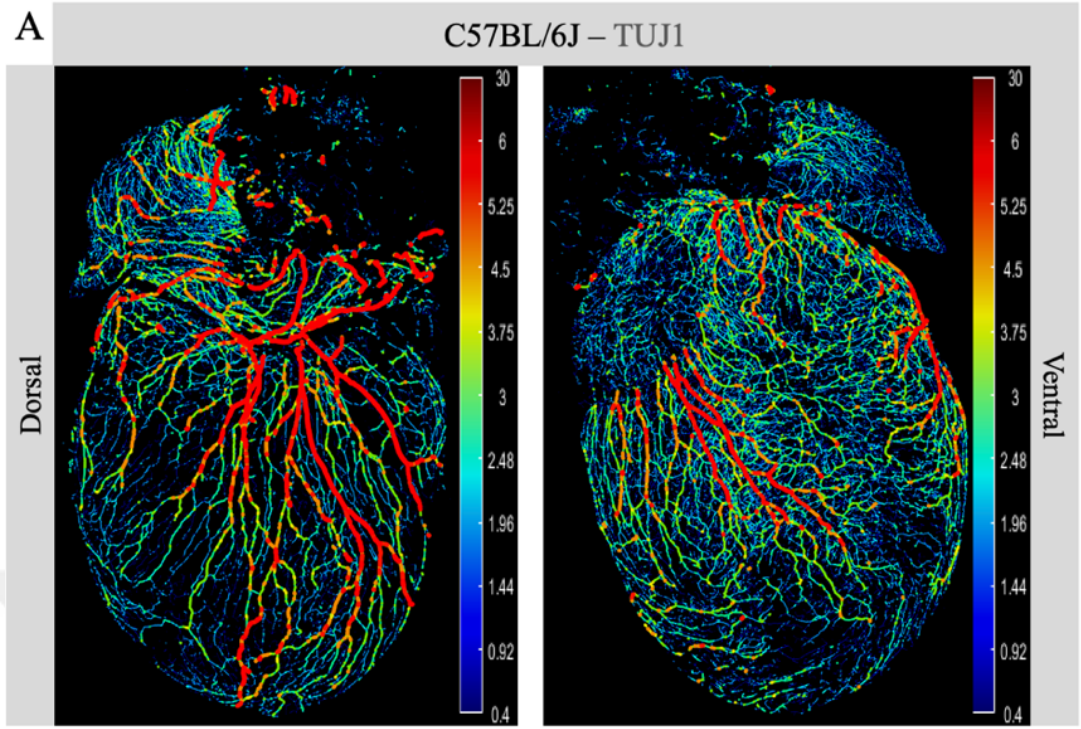
Tekli antikor immünokimyasal boyaması ile kalbin genel inervasyon haritası LSM880 konfokal mikroskopunda 5X objektif ile çekilen görüntüler ile oluşturuldu. TUJ1 proteini için immün işaretlenmiş vahşi tip fare kalplerinde, tüm sinir liflerinin global haritası kalbin hem dorsal hem de ventral yüzünde yoğun şekilde inerve olarak gösterildi (n: 3, Şekil 6.31, Şekil 6.32 A). Genel olarak, TUJ1-IR liflerinin, kalbin dorsal yüzünde ventral yüzünde göre önemli ölçüde daha yoğun yerleşim gösterdiği görüldü (p= 0.02, Şekil 6.32 B). İlginç bir şekilde,  $>5\mu\text{m}$ 'dan daha büyük ve  $<5\mu\text{m}$ 'dan daha küçük TUJ1-IR sinir lifi demetlerinin dağılımı dorsal yüzde benzer bir dağılım gösterirken,  $<5\mu\text{m}$ 'dan daha küçük olan sinir aksonları ventral yüzde önemli ölçüde daha yüksek prevalans gösterdi (p= 0.042, Şekil 6.32 C).



C57BL/6J – TUJ1



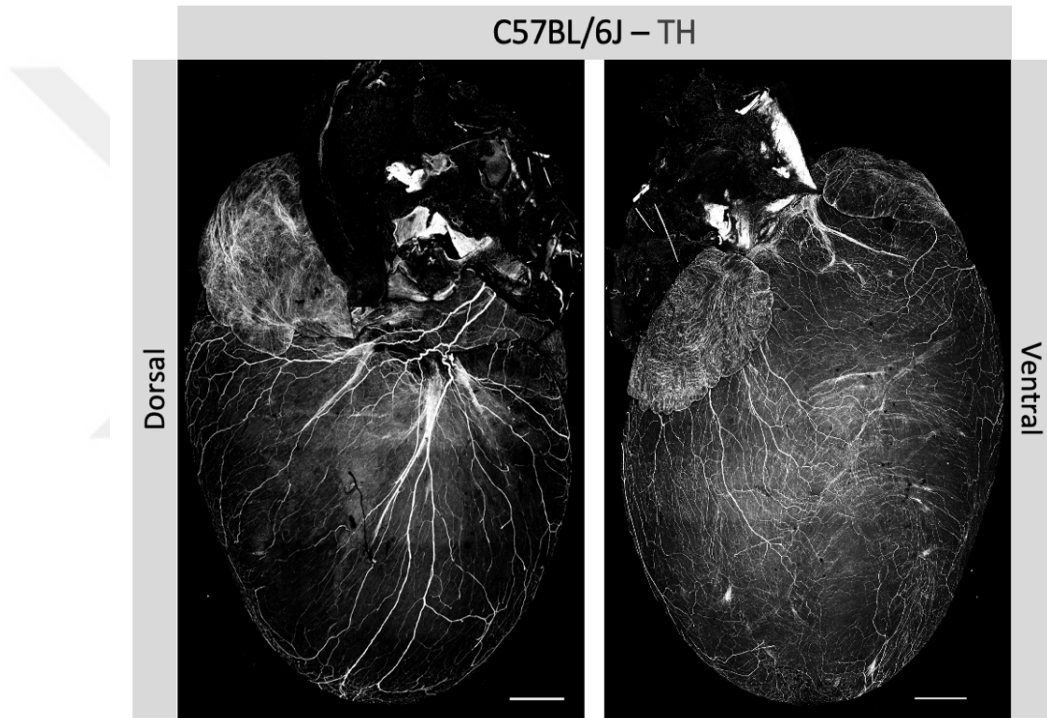
**Şekil 6.31** C57BL/6J vahşi tip farelerin kalbinin dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) yüzünde anti-TUJ1 antikoru ile tüm inervasyonun global görünümü. Ölçek çubukları 1 mm'dir.



**Şekil 6.32** C57BL/6J vahşi tip farenin kalbinde 3B kardiyak inervasyonunun dorsal ve ventral yüzde karşılaştırmalı analizi. A. TUJ1 immün boyama ile vahşi tip kalbin sinir yoğunluklarının dorsal ve ventral yüzde görünümü ve B. ölçümü ( $p=0.02$ , t-test)  $n=3$ . C. TUJ1-IR ile C57BL/6J'nin ventral ve dorsal yüz  $>5\mu\text{m}$  ve  $<5\mu\text{m}$  çapındaki sinir liflerinin prevalansları ( $p=0.042$ , t-testi)  $n=3$ . Ölçek çubukları 1 mm'dir.

### 6.6.2. Kalbin TH-IR sempatik inervasyonunun haritalanması

Afferent inervasyonun tüm kalpteki aksonal ve sinir sonlanma paternlerindeki efferentlerden farkını incelemek için VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 ikili transgenik fare kalpleri anti-RFP ve anti-TH antikoları ile birlikte immüno işaretlemesi gerçekleştirilmeden önce vahşi tip fare kalplerinde anti-TH ile immüno işaretleme yapıldı. VGLUT2 eksprese eden afferentlerden farklı olarak, dorsal görünümde TH-IR efferent inervasyonu ventriküllerin üst yüzünde daha kalın lif demetlerinin olduğu ve dallanarak apekse doğru incelendiği gösterildi (Şekil 6.33, Şekil 6.25).



**Şekil 6.33** TH-IR sempatik liflerin C57BL/6J vahşi tip kalplerin dorsal (sol panel) ve ventral (sağ panel) yönünde genel görünümü. Ölçek çubukları 1 mm'dir.

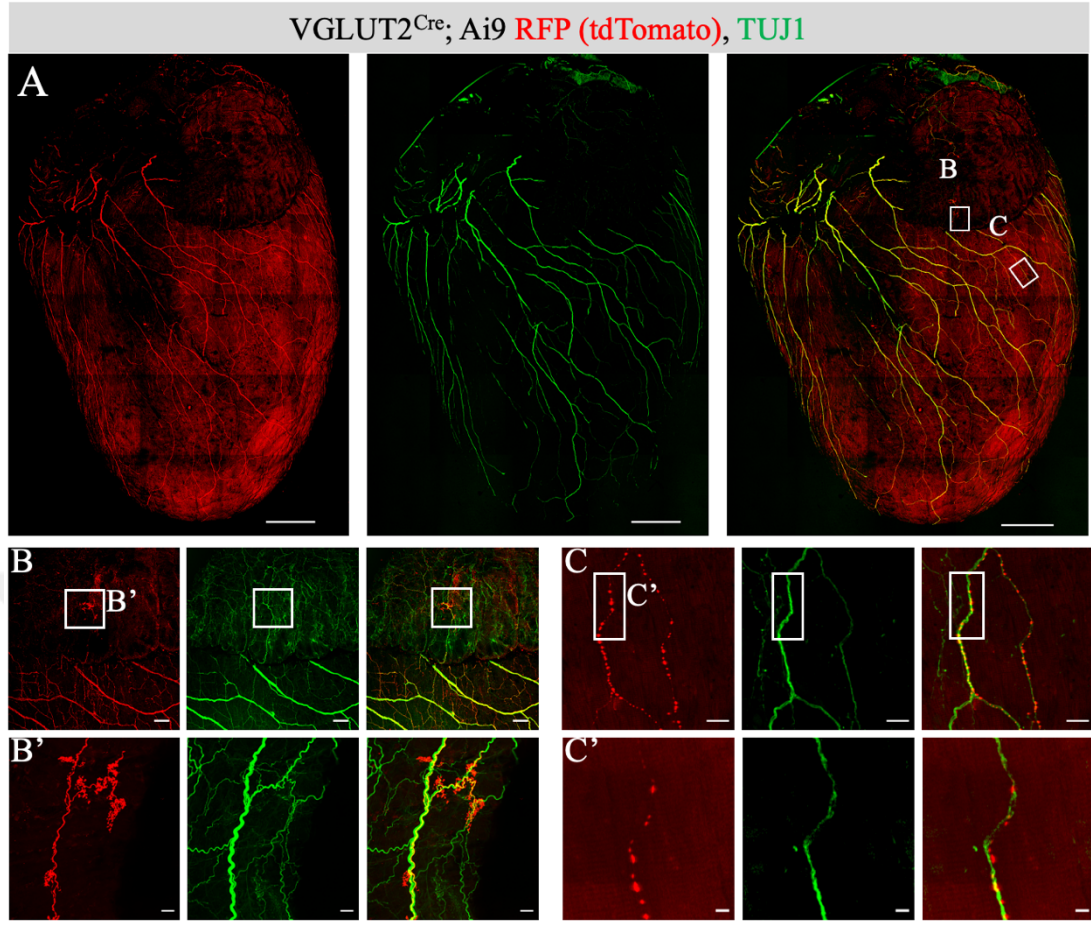
### 6.6.3. Kalbin VGLUT2 ifade eden afferent inervasyonunun sempatik ve genel inervasyon ile birlikte görüntülenmesi

Vahşi tip ve VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik fare kalpleri Pan-nöronal marker TUJ1 proteini, sempatik efferent spesifik marker olan TH ve/veya VGLUT2 ifadesi ile ilişkili tdTomato floresan şiddetini arttırmak için RFP (Şekil 6.34, Şekil 6.35)

antikorları ile immünokimyasal olarak boyandı. İkili antikor stratejisinde antikorların birlikte eklenmemesi nedeni ile teknik olarak tek antikorlu immüno işaretlemenin iki katı sürede kalpler görüntüleme için hazır hale getirildi. Kalplerin 5X global ve 20X ve alan yakınlaştırılarak yapılan manuel büyütme ile detaylı çekimler gerçekleştirildi.

#### ***6.6.3.1. Kalbin afferent inervasyonunun genel inervasyon ile birlikte görüntülenmesi***

VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik farelerin kalbinde ikili immüno-etiketleme stratejisi kullanarak TUJ1-IR ağı ile birlikte RFP-IR ile glutamaterjik afferentler işaretlenerek iki popülasyon birlikte değerlendirildi (Şekil 6.34 A). Ayrıntılı yüksek büyütme görüntülemesinde, RFP-IR glutamaterjik nöronların TUJ1 proteininin ifadesi ile lokalize olduğu ancak farklı olarak çiçek benzeri sinir uçları (Şekil 6.34 B, B') ile birlikte varikoz yapıların da (Şekil 6.34 C) işaretlendiği gösterildi. Varikozlar, VGLUT2 eksprese eden afferentlerin tek aksonları boyunca saptanabildi (Şekil 6.34 C'). Toplam yoğunluk analizine göre, VGLUT2 eksprese eden kardiyak afferent inervasyonu TUJ1 ekspresyonu ile tespit edilen toplam inervasyonun %20-30'u olarak tespit edildi (Şekil 6.27 A, 6.32, 6.34 A).



**Şekil 6.34** TUJ1-IR ve VGLUT2 eksprese eden RFP-IR işaretli afferentlerin birlikte 3B inervasyonu. A. Kalp üzerinde RFP-IR afferentleri ve TUJ1-IR sinir liflerini ifade eden ikili immün işaretli VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik fare kalbinin görüntülenmesi. (A)'da kutulanmış çiçek benzeri sinir uçlarının (B, B') ve afferentlerin varikoz yapılarının ayrıntılı görünümü (C, C') ayrı ayrı gösterilmiştir. (A), 5X büyütme ile çekilmiştir. (B) ve (C), 20X büyütme ile toplanmıştır. (B') 2X, (C') 6.4x yakınlaştırma ile çekildi. (A) için ölçek çubukları 1 mm'dir; (B) 200 µm, (B') ve (C) için 20 µm; ve (C') için 5 µm'dir.

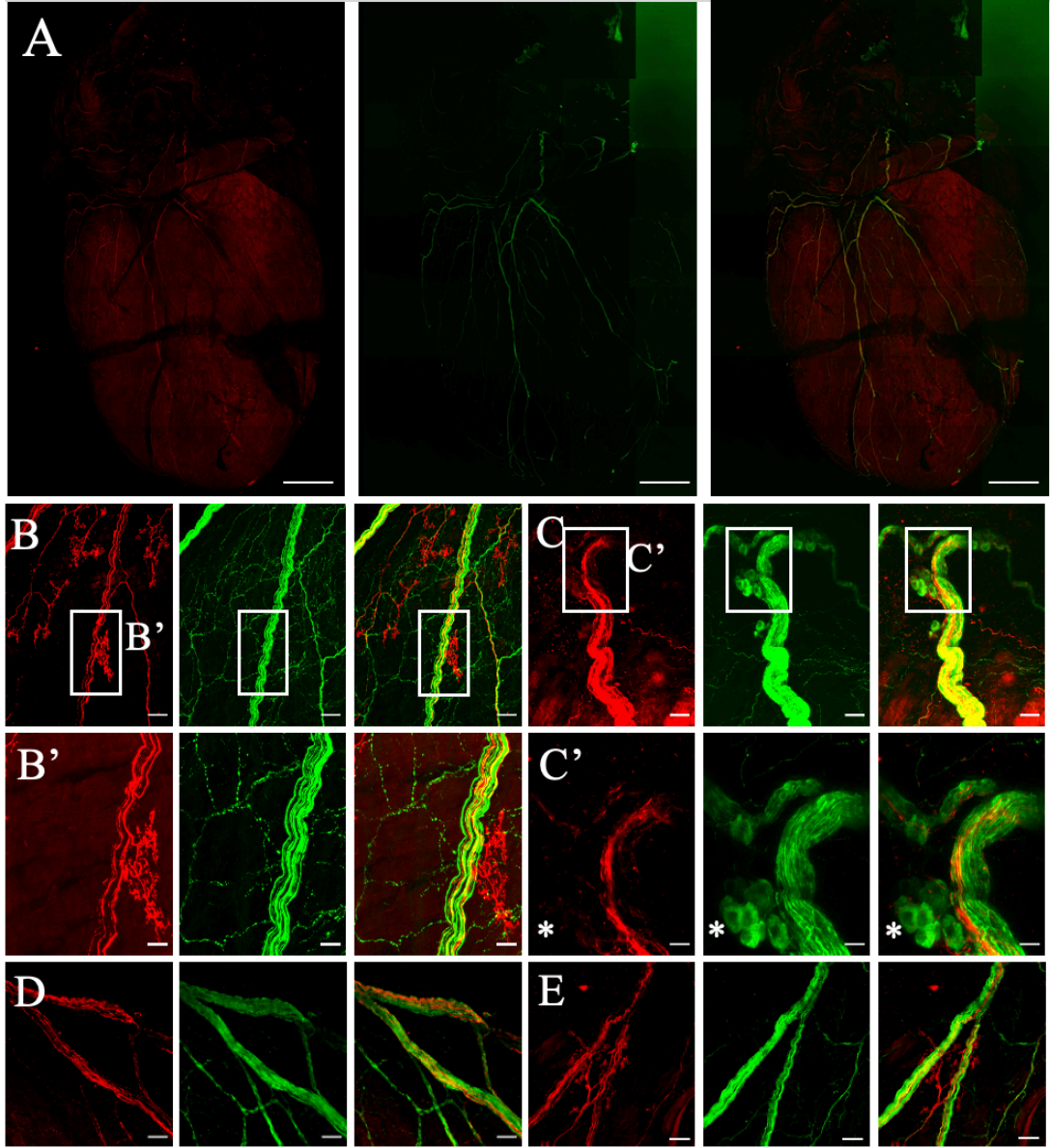
### 6.6.3.2. Kalbin afferent inervasyonunun sempatik inervasyondan ayrıştırılması

Afferent inervasyonun tüm kalpteki aksonal ve sinir sonlanma paternlerindeki efferentlerden farkını incelemek amacıyla VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 fare kalplerinin anti-RFP immün boyaması ile afferentler işaretlenirken, anti-TH antikoruna ile sempatik lifler işaretlendi (Şekil 6.35, Şekil 6.36). Farklı iki dalga boyuna ait antikorlar ile işaretlenen kalpler LSM880 konfokal mikroskobunda iki ayrı lazerle uyarılarak görüntülendi (Şekil 6.35). Bulgularımız, noradrenerjik ve glutamaterjik fasiküller içeren çok sayıda

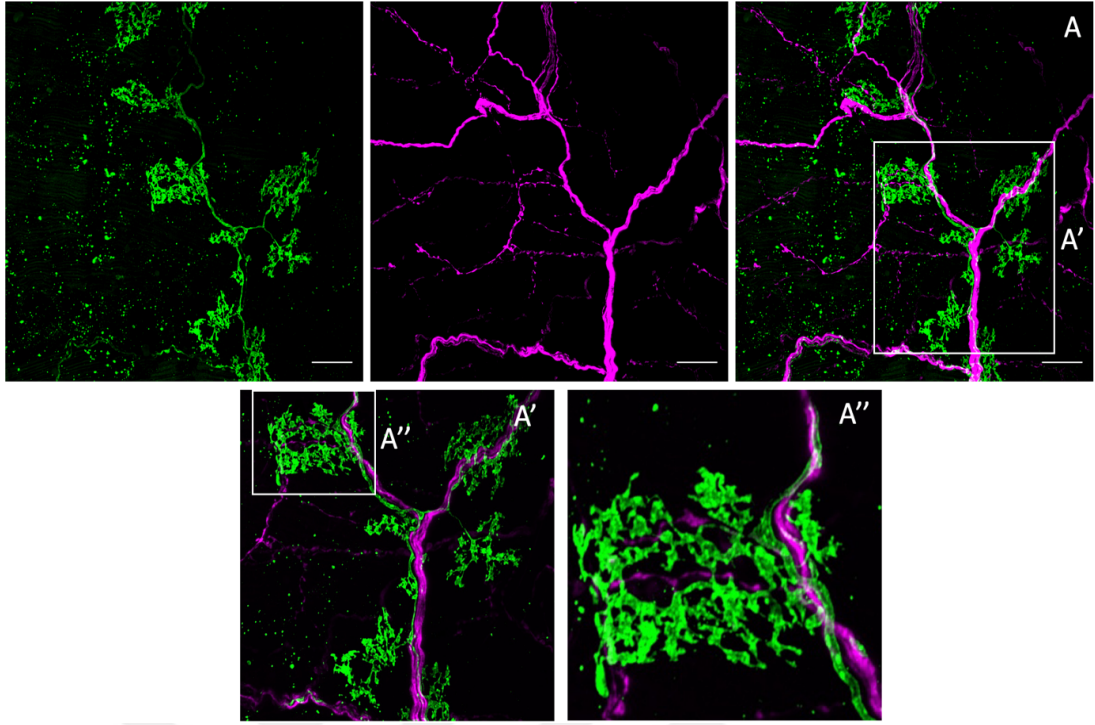
sinir demetinin ventrikül boyunca birlikte ilerlediğini gösterirken, fasiküllerden dallanan yalnızca TH-IR liflerin de tespit edildiğini ortaya koydu (Şekil 6.34). Çiçek benzeri sinir sonlanmaları, sempatik lifler tarafından değil, yalnızca RFP-IR olan glutamaterjik afferentler tarafından görüntülendi (Şekil 6.35 B, B', E). Önemli olarak, kardiyak afferentleri temsil eden RFP-IR, yalnızca aksonlarda ve sinir uçlarında saptanırken, kalp boyunca VGLUT2 ifade eden herhangi bir afferent soma saptanmadı (Şekil 6.35 B, C).

Boyama ve görüntüleme yaklaşımımızla, kardiyak gangliyonlar da bulunan nöronların değişen şekilleri ve yoğunluğu ile belirgin bir şekilde tespit edildi (Şekil 6.13 D, 6.35 C, C'). Yüksek büyütme görüntüleme ile TH-IR gösteren küçük gangliyonlar, küçük yoğun floresan hücreler (SIF) (67) ve kalp kas lifleri çevresindeki varikozlar (182) üzerinde VGLUT2-afferentlerinin hücresel sonlanmaları ayrıntılı şekilde görselleştirildi (Şekil 6.35 C). Global görüntüleme sonrası kalbin farklı bölgelerinden yapılan görüntülemelerde fasiküller içerisinde birlikte seyreden sempatik ve afferent lifler sonlanmalarda birbirinden ayrıştığı gözlemlendi (Şekil 6.35 D, E).

VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9 RFP (tdTomato), TH



**Şekil 6.35** TH-IR sempatik lifler ve VGLUT2 Cre bağımlı tdTomato ifade eden RFP-IR afferentlerin birlikte inervasyonu. A. Efferent ve afferent inervasyonun birlikte haritalanmasının global görüntüsü. Yalnızca RFP-IR olarak görüntülenen çiçek benzeri akson sonlanmaları (B, B') ve TH-IR ana nöronları ve SIF hücreleri (C, C') üzerindeki RFP-IR afferent peri-hüresel sonlar. D. Fasiküler liflerin içerisinde efferent ve afferentlerin görüntüleri. E. RFP-IR olan çiçek benzeri sonlanmaların fasiküllerden dallanmış görüntüleri. (A), 5X büyütme ile çekilmiştir. (B), (C), (D) ve (E) 20X büyütme ile toplanmıştır. (B') ve (B') 2.5X yakınlaştırmaya sahiptir. (A), için ölçek çubukları 1 mm'dir; (B), (B'), (C), (C'), (D) ve (E) için 20 µm'dir.



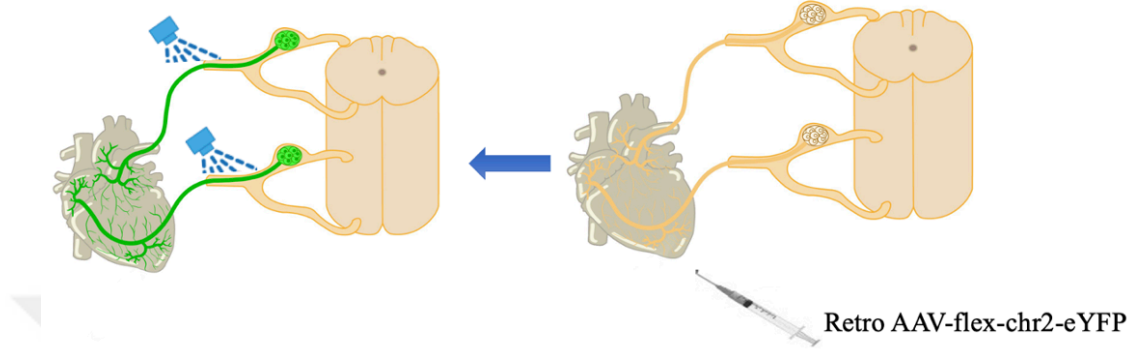
**Şekil 6.36** VGLUT<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik fare kalbinin ventrikülünde afferent ve efferent sinir lifinin birlikte görüntülenmesi. A. Efferent liflerin TH-IR (magenta) ve afferent liflerin RFP-IR (yeşil) ile birlikte işaretlenmesi. 40X büyütme ile alınan görüntüde TH-IR sempatik akson lifleri, VGLUT2 ifade eden duyu lifleri ile çevrelenmiştir. (A)'da gösterilen sinir uçlarının ayrıntılı görünümü, (A')da ayrıca gösterilmiştir. (A')daki çiçek spreyi morfolojisi, (A'')deki yakınlaştırılmış görüntüde gösterilmiştir. Ölçek barları: 20 µm'dir.

### 6.7. Spinal ve Vagal Kökenli Duyu Nöronlarının Kalp Fonksiyonu Üzerine Etkilerinin Optogenetik Yöntemlerle Tanımlanması

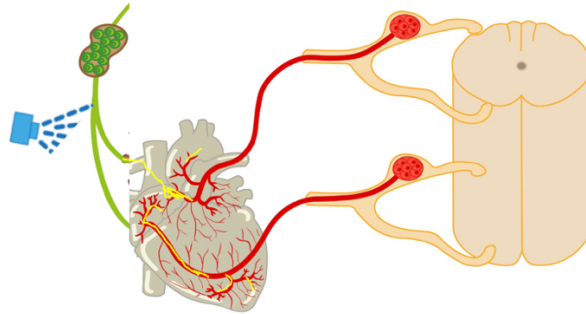
Kalbin sempatik ve parasempatik sinir sistemi ile yoğun olarak inerve edildiği ve fonksiyonları bilinmektedir. Ancak literatürde afferent inervasyonun kalbin yüzeyinden taşıdığı bilgi hala net olarak tanımlanabilmiş değildir. Afferent inervasyonun kalbin fonksiyonuna etkisinin ortaya çıkarılması optogenetik teknolojisinin yardımıyla gerçekleştirilebilir. Bu nedenle fare kalbini inerve eden duyu sinir fasiküllerinin optogenetik uyarım yolu ile depolarize edilebilmesi için ilk olarak duyu sinirlerinde 465-495 nm dalga boyunda ışık ile aktiveleşen ChR2 proteininin ürettirilmesi gerekmektedir. Tez çalışmasında iki farklı strateji ile VGLUT2-Cre farelerin fonksiyon çalışmalarında kullanılabilir hale getirilmesi planlandı. 1.



VGLUT2-Cre farelerde Chr2 üretimi viral yöntemle yapılmaya çalışıldı (Şekil 6.37).  
2. Cre-loxP sistemi kullanılarak VGLUT2-Cre transgenik faresinin loxP-ChR2 transgenik fare ile çaprazından elde edilen VGLUT2::Chr2-eYFP ikili transgenik fareler kullanıldı (Şekil 6.38).



**Şekil 6.37** VGLUT-Cre transgenik farenin kalbine virüs enjeksiyonu sonrası AKG gangliyondan dallanan aksonların optogenetik olarak uyarılmasının şematik gösterimi.



**Şekil 6.38** VGLUT<sup>Cre</sup>;ChR2-EYFP transgenik farenin vagus sinirinin optogenetik olarak uyarılmasının şematik gösterimi.

### 6.7.1. Kanalrodopsin üretimi viral yöntemle gerçekleştirilerek AKG kökenli duyu nöronlarının işaretlenmesi ve fonksiyonel olarak değerlendirilmesi

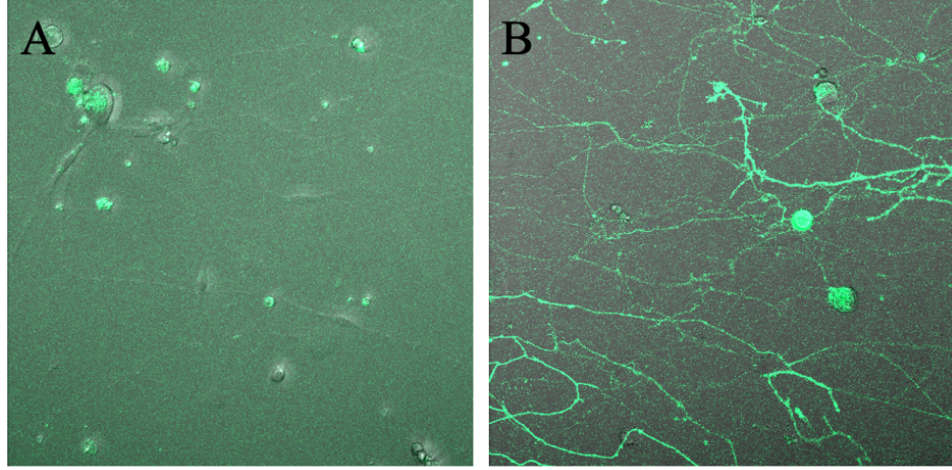
Viral yöntem kullanılarak kalbe özgü duyu nöronlarının işaretlenmesi ve optogenetik uyarı ile fonksiyon çalışmaları yapılması planlandı. Bu doğrultuda uygun

virüs üretimi sonrası virüs miktar hesaplaması, *in vitro*'da uygulanması ve sonrasında kalbe, AKG gövdelerine ve intratekal enjeksiyonları gerçekleştirildi.

#### **6.7.1.1. Virüs üretimi ve hücre kültüründe değerlendirilmesi**

Virüs üretimi için 1. Virüsün kapsidini oluşturacak plazmid, 2. Kapsid içerisinde yer alacak ve ürettirmek istediğimiz proteini içeren plazmid ve 3. Virüs oluşumuna yardımcı proteinleri içeren yardımcı (helper) plazmidi gerekmektedir. Addgene firmasından temin edilen plazmidlerin virüs üretimi için gerekli miktarlara çoğaltılması ve saflaştırılması gerçekleştirildikten sonra retrograd ileryen Retro-AAV kapsidi ve periferik sinir sistemini enfekte eden yakın zamanda tasarlanıp üretilen PHP.S-AAV kapsidi kullanıldı (172). pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA plazmidini içeren virüs üretimi için her iki kapsid de kullanıldı. *In vivo* uygulamalar öncesi elde üretilen virüslerin hesaplamalarla tutarlı olarak enfekte oranı *in vitro* ortamda değerlendirildi. HEK293-AAV hücrelerinde üretilip saflaştırıldıktan sonra qRT-PZR yöntemi ile titre edilerek mikro litrede  $4 \times 10^{10}$  virüs partikülü olduğu belirlendi. Üretilen virüs *in vivo* ortamda denenmeden önce *in vitro* ortamda VGLUT2-Cre transgenik fareden izole edilen ve kültür edilen AKG nöron hücreleri virüs ile transfekte edildi. Kontrol hücrelerine göre ChR2-EYFP füzyon proteininin sinyallerinin anlamlı şekilde artmış olduğu görüldü (Şekil 6.39). Laboratuvarında ürettiğimiz virüse ek olarak Addgene firmasından temin edilen AAV-CAG-hChR2-H134R-tdTomato (AAV Retrograde) (Addgene #28017-AAVrg) virüsü titresi  $1.87 \times 10^{13}$  olmasına rağmen soğuk zincirde taşınmaması sebebi ile q-RT-PZR ile yeniden titre edilerek konsantrasyonu belirlendi ve *in vitro*'da HEK hücrelerinde, *in vivo*'da da kalbe enjekte edilerek kontrol edildi. Ancak virüsün veriminin düşük oluşu nedeni ile çalışmalarda kullanılmamaya karar verildi.

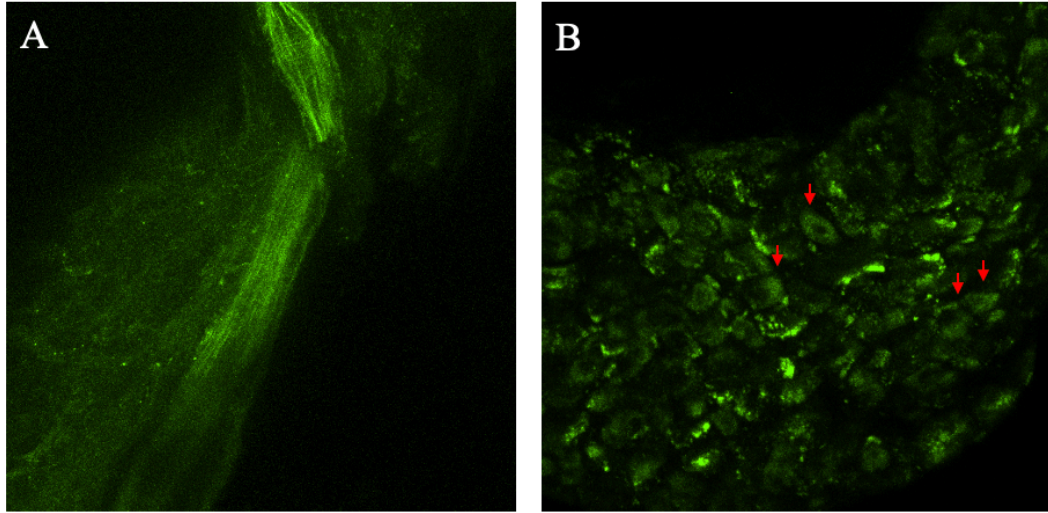
Kendi ürettiğimiz virüsler hesaplamalar ve *in vitro* uygulama sonrası *in vivo* enjeksiyonlarda kullanıldı.



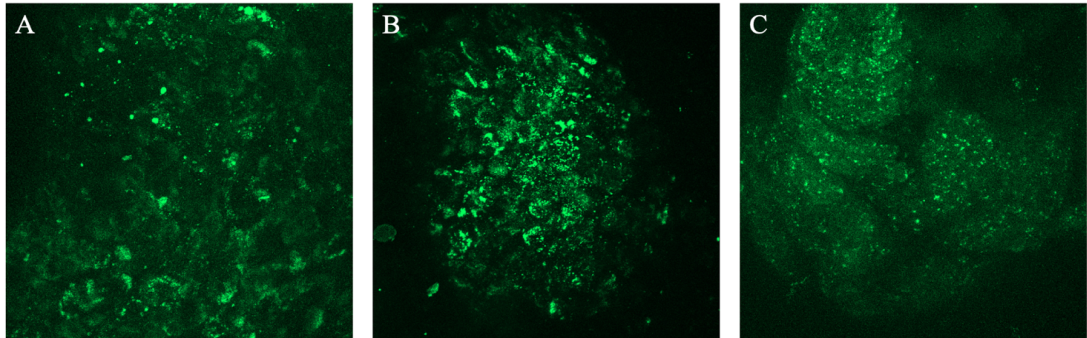
**Şekil 6.39** Üretilen AAV-PHP.S-chr2-eYFP virüsler ile *in vitro* ortamda enfekte edilmiş VGLUT2-Cre transgenik fareden izole edilen AKG nöronları. A. Virüs ile enfekte olmamış kontrol grubu AKG nöronları. B. AAV-PHP.S-chr2-eYFP ile transfekt edilmiş AKG nöronlarında 5 gün sonraki EYFP ekspresyonu.

#### **6.7.1.2. AKG özgü optogenetik uygulama amacıyla intratekal ve kalbe virüs enjeksiyonu sonrası değerlendirilmesi.**

Spinal kökenli fonksiyon analizlerinin yapılabilmesi için virüs enjeksiyonlarının direkt olarak AKG gövdelerine veya intratekal olarak uygulanması planlandı. Ancak PHP.S kapsidi içerisinde verilen AAV-ChR2\_EYFP virüsünün enjeksiyondan 1 hafta sonra disekte edilen AKG dokularında hücre gövdelerinde ve aksonlarda EYFP proteininin çok az ifade edildiği kalbe dallanan aksonlarda ise ifade edilmediği görüntüledi (Şekil 6.40). AKG aksonlarında ifadesi konfokal mikroskobu altında görüntülenen EYFP proteininin (Şekil 6.40 A) çok az sayıda AKG gövdelerinde ifadesi gösterildi. (Şekil 6.40 B). Bir diğer yöntem olarak, kalbin yüzeyine yapılan retrograd olarak ilerleyen virüs enjeksiyonu sonrası izole edilen AKG ve NG gövdelerinde herhangi bir EYFP ifadesine rastlanmadı (Şekil 6.41). Bu sonuçlar doğrultusunda üretilen virüs titrelerinin *in vitro* uygulamalarda yeterli ancak *in vivo* uygulamalar için yeterli olmadığı yapılan tekrarlı deneyler ile doğrulandı.



**Şekil 6.40** VGLUT2-Cre transgenik fareye intratekal PHP.S\_ChR2\_eYFP virüs enjeksiyon sonrası AKG doku görüntülemesi A. T3 segmentine ait AKG aksonunda ve B. T4 segmentine ait AKG gövdesinde EYFP protein ifadesi.



**Şekil 6.41** VGLUT2-Cre transgenik farenin kalbine RetroAAV\_ChR2\_eYFP virüs enjeksiyonu sonrası doku takibi. A. Virüs enjekte edilmeyen VGLUT2-cre transgenik fareye ait kontrol AKG dokusu. Virüs enjekte edilen fareye ait B. NG ve C. AKG dokusu.

### 6.7.2. Transgenik fare modellerinde kalbe özgü duyu nöronlarının fonksiyonel olarak değerlendirilmesi

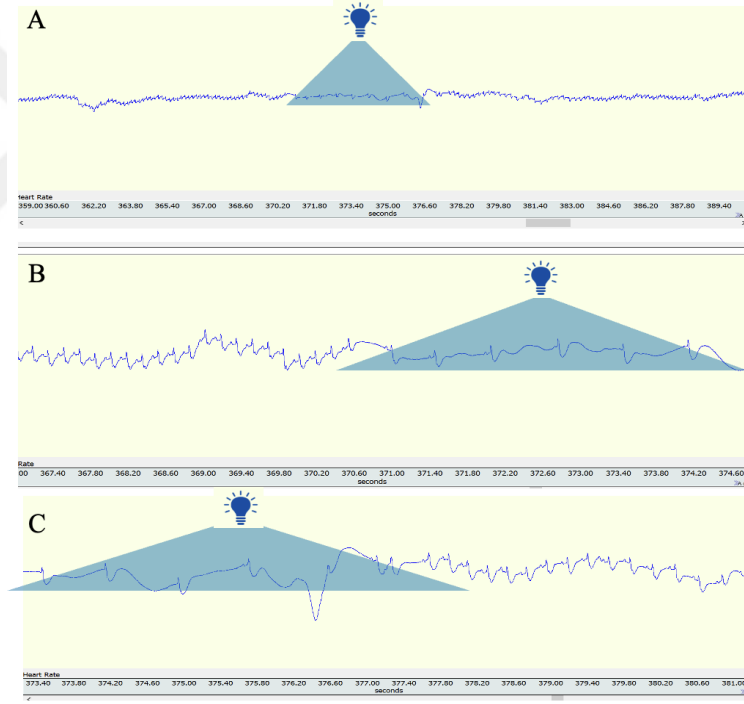
Bütün duyu nöronlarında kanalrodopsin 2 geni ifade edecek transgenik soyların üretimi Cre-loxP sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. VGLUT2 geni kontrolünde cre rekombinaz proteini üreten transgenik fare (VGLUT2-Cre), loxP sekans dizisi içeren ve hücrelerde transkripsiyonu sadece Cre rekombinaz aktivitesine bağımlı olarak

gerçekleşebilen kanalrodopsin2-EYFP füzyon geni içeren transgenik fare ile üreme kafesleri oluşturuldu.

VGLUT2::ChR2-EYFP ikili transgenik farelerin 465-495 nm dalga boyuna sahip ışık uyarısına yanıtının kontrolü fiberin farelerin ayağına tutulması ile gerçekleştirildi. Vahşi tip farelerde ve VGLUT2::ChR2-EYFP ikili transgenik farelerde kontrollü olarak gerçekleştirilen çalışmada kanalrodopsin ifade eden farelerin ayak çekme refleksinin olduğu vahşi tip farelerde ise herhangi bir yanıt oluşmadığı gözlemlendi. Ayak çekme hareketi ile fonksiyonel olarak doğrulanan farelerin vagus siniri uyarılması ile eş zamanlı olarak alınan EKG kayıtları incelendiğinde atım sayısında herhangi bir değişiklik tespit edilememesi nedeni ile optogenetik uygulamalar fareler ketamin/rompun ikilisi yerine isofluran sistemi kullanılarak anestezi altına alındı. Tez kapsamında yapılan *in vivo* fare deneylerinde anestezi madde olarak Ketamine ve Rompun kimyasalları intraperitoneal olarak uygulanmaktadır. Ketamin molekülünün beyindeki N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) reseptörlerini blokladığı gösterilmiştir (183). NMDA reseptörleri, öğrenme ve hafıza için gerekli olan sinaptik iletim ve plastisitede önemli rollere sahip glutamat kapılı kalsiyum geçirgen iyon kanallarıdır. Duyu sinir uçlarından arka beyinde salgılanan glutamate molekülleri NMDA reseptörlerine bağlanarak taşınan duyu sinyalinin merkezi sinir sistemine iletilmesinin sağlarlar. Ketamin NMDA reseptörlerini bloklayarak glutamat üzerinden duyu iletimini engeller ve farenin uyuşması böylelikle sağlanmış olur. Rompun / Xylazine molekülü ise merkezi alfa-adrenerjik reseptörlere bağlanarak merkezi sinir sisteminde dopamin ve noradrenalin salınımını düşürür ve yatıştırıcı, kas gevşetici ve analjezik olarak kullanılır. Ketamin ve Rompun birlikte kullanılarak farelerin iskelet kaslarında gevşeme sağlanmış olarak operasyona tepkisiz hale getirilmiş oluyorlar. VGLUT2::ChR2 ikili transgenik fareler optogenetik uyarım deneyleri için Ketamin-Rompun ile anesteziye alındılar. Vagal stimülasyon sonucu EKG’de bir değişim elde edilemedi. Yüksek şiddette yapılan uyarıya rağmen EKG’de herhangi bir etki görülmediğinden literatürdeki bilgiler doğrultusunda anestezi madde değiştirilmesi ile isofluran sistemini kullanıldı. Optogenetik uyarım sırasında kalbin elektriksel aktivitesinde meydana gelen değişimler eş zamanlı EKG kayıtları alınarak takip edildi. Uyarı öncesi, sırasında eş zamanlı olarak ve sonrasında EKG kayıtları için Biopac MP36 Sistemi cihazı kullanıldı.

Optogenetik uyarı deneylerinde AKG kökenli kalbe özgü afferentlerin fonksiyonlarının ayrıştırılmasında planlanan viral uygulamalar yeterli verim alınamaması nedeni ile uygulanamadı. Virüs uygulaması yerine loxP-ChR2 transgenik soyu kullanılarak optogenetik uyarıların yanıtları eş zamanlı olarak alınan EKG kayıtları ile analiz edildi.

VGLUT2-Cre::ChR2 ikili transgenik farelere optik fiber aracılığı ile vagus sinirinin alt dalına, kalbe ve T-segmenti AKG'lere diod lazer fiber ışık kaynağıyla 50-100 mWatt arasında değişen lazer gücü kullanılarak, 5 ms pulse , 50 Hz olacak şekilde 10 sn boyunca uyarıldı. Uyarım sonucunda kalpte meydana gelebilecek kasılıp gevşeme kinetiğindeki değişiklik eş zamanlı EKG ile takip edildi. Vagal uyarı ile eş zamanlı olarak kalp atım ritminde azalma gözlemlendi (Şekil 6.42).



**Şekil 6.42** VGLUT2-Cre:ChR2 transgenik farede vagal demetinin optogenetik uyarımının kalp atımına etkisinin EKG ile gösterimi. A. Optogenetik uyarım öncesi, 10 saniyelik uyarım ve uyarım sonrası EKG dalgalarının görünümü. B. Uyarım öncesi ve uyarım başlangıcındaki EKG dalgalarının büyütülmüş görüntüsü. C. Uyarımın bitişi ve uyarım sonrası EKG dalgalarının büyütülmüş görüntüsü. Mavi renkli ampul: optogenetik uyarımı sürecini göstermektedir. Mavi alanla gösterilen alan uyarı zamanındaki EKG dalgalarını göstermektedir. Diğer alanlar lazer uyarısının yapılmadığı zaman dilimindeki EKG kayıdır.

Spinal kökenli duyu nöronlarının kalp fonksiyonu üzerine etkilerinin *in vivo* transgenik fare modellerinde optogenetik yöntemlerle tanımlanması için VGLUT2::ChR2 transgenik faresinde AKG gövdelerinin ve kalbe dallanan fiberlerin cerrahi yöntemlere kasların arasından görünür hale getirilip optik fiber yardımı ile uyarıcı ışığın AKG gövdesine veya aksonuna uygulanması planlandı (Şekil 5.10). Kalbe inervasyonu olan AKG nöronlarının gövdelerinin çoğunlukla T1-T4 segmentinde olduğu bilinmektedir. Bu segmentlerin farenin sırtında omuz kemiklerinin altında yer alması nedeni ile anatomik olarak alt segmentlere göre cerrahi olarak ulaşılmasının daha zor olduğu yapılan operasyonlarda tespit edildi. Teknik olarak mevcut şartlar ile spinal kökenli duyu nöronlarının uyarılması ve fonksiyonel analizinin yapılması sağlanamadı.

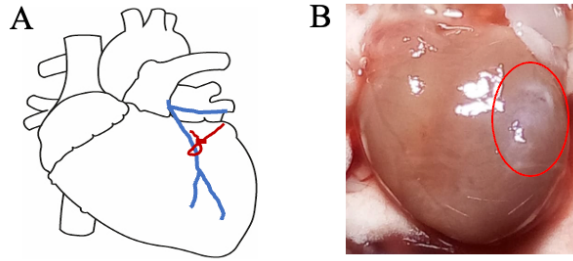
VGLUT2::ChR2 ikili transgenik fare dışında AKG özelinde ifadesi doğrulanan genlere ait Mrgprd::tdTomato, Pvalb:: tdTomato, Slc17a8:: tdTomato ikili transgenik farelerin üretimi yapıp doğrulaması genotipleme ve görüntüleme teknikleri ile yapıldı (Şekil 6.2, 6.3 ve 6.4). Ancak üç fare soyunun da global kalp inervasyonu görüntülemelerinde akson sonlanmalarına hiç veya az sayıda rastlanması nedeni ile optogenetik uyarı ile fonksiyon çalışmaları gerçekleştirilemedi.

## **6.8. MI Sonrası Kardiyak Afferent, Sempatik Global Sinir Ağının Yeniden Modellenmesi**

Sağlıklı kalpte glutamaterjik afferent inervasyonunun global haritasının görüntülenmesi kalpte hasar oluşturan miyokard infarktüs sonrası inervasyondaki değişimi ve yeniden düzenlenmesini kıyaslamak için bu tez kapsamında yapılan önemli bir çalışmadır. Bütüncül 3B görüntülemenin sağladığı kapsamlı analiz imkanı ile sağlıklı-MI sonrası genel sinir ağı, sempatik ve afferent kıyaslaması yapıldı. Tez çalışmasında elde edilen bütüncül görüntüler infarktüsün özellikle hasar alanı, hasar çevresi ve hasara uzak alanda yarattığı etkinin kapsamı hakkında detaylı bilgi vermektedir.

### 6.8.1 MI Modeli Optimizasyonları

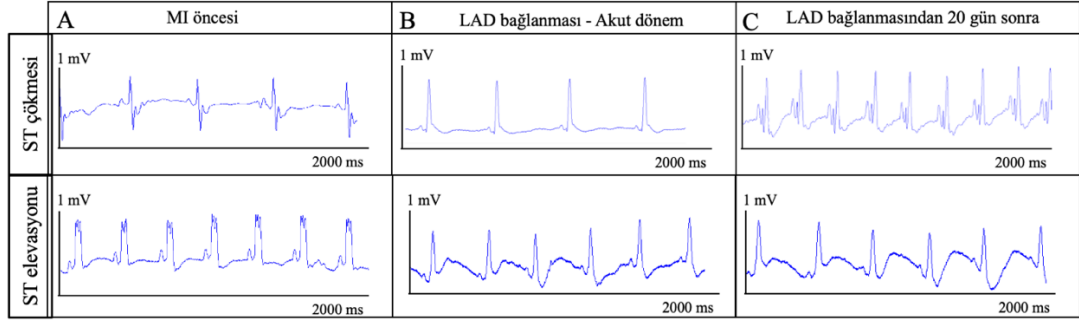
MI kaynaklı iskemik kardiyak hasarından sonra glutamaterjik afferentlerin ve genel sinir ağının nöral yeniden şekillenmesini karakterize etmek için VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik farede veya vahşi tip kontrollerinde, inervasyon modelleri ve sinir filizlenmesi görüntüleme ile gösterilirken hasarın kalbin elektrofizyolojisine etkisi EKG cihazı ile alınan kayıtlarla analiz edildi. Miyokard infarktüs modeli için LAD koroner arterin bağlanması, kuru buz ile dondurulmuş ve köreltilmiş metal enjektör ucunun kalbin yüzeyine dokundurulması ve bu işlemin birden fazla kez tekrarlanması gibi yöntemler denendi. İşlem sonrası bütün farelerden akut ve geç dönemde EKG çekimleri gerçekleştirildi. Bütün modellerde hasar oluşumu sağlanmış olmasına rağmen kuru buz yönteminin tekrarlanabilirliği ve farklı farelerde kalp atarken benzer bölgeye işlem uygulanması problemi olduğundan MI modelini oluşturmak için, LAD koroner arteri kalıcı olarak bağlanması yöntemi tercih edildi (Şekil 6.43). Farenin entübasyon ile stabilize hale gelmesini takiben göğüs kafesi açılarak kalp görünür hale getirildi. Kalbin yüzeyindeki perikard tabakasının açılması ile kalbin oryantasyonun göre LAD emilebilir ve ince ip ile dikildi (Şekil 6.43) (22,150).



**Şekil 6.43** MI modelinin grafiksel ve kalp üzerinde gösterimi A. LAD'nin bağlanması ile MI modeli oluşturulması (mavi: LAD, kırmızı: iplik), B. MI sonrası kalbin ventral yönünde meydana gelen doku hasarı görüntüsü.

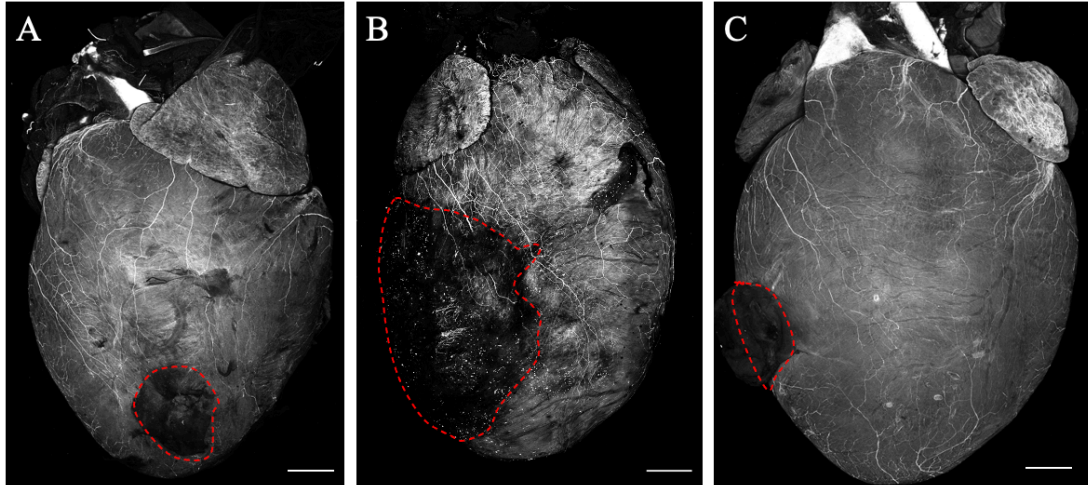
LAD bağlanması sonrasında fare sağ kalım oranının düşük olması sebebi ile entübasyon süresinin minimize edilebilmesi için operasyon sırasında EKG çekiminin kayıt alınabiliyorsa yapılmasına, cihazın optimizasyonu gerekiyorsa EKG çekiminin işlem sonrası yapılması ile elektrofizyolojik kayıtlar alındı. Böylelikle farelerden alınabiliyorsa operasyon öncesi, sırası ve hemen sonrasında elektrokardiyografik kayıtlar alındı. MI sonrası farelerde ST segment depresyonu elektrokardiyografi ile MI öncesi kayıtlarla kıyaslanarak doğrulandı (Şekil 6.44).



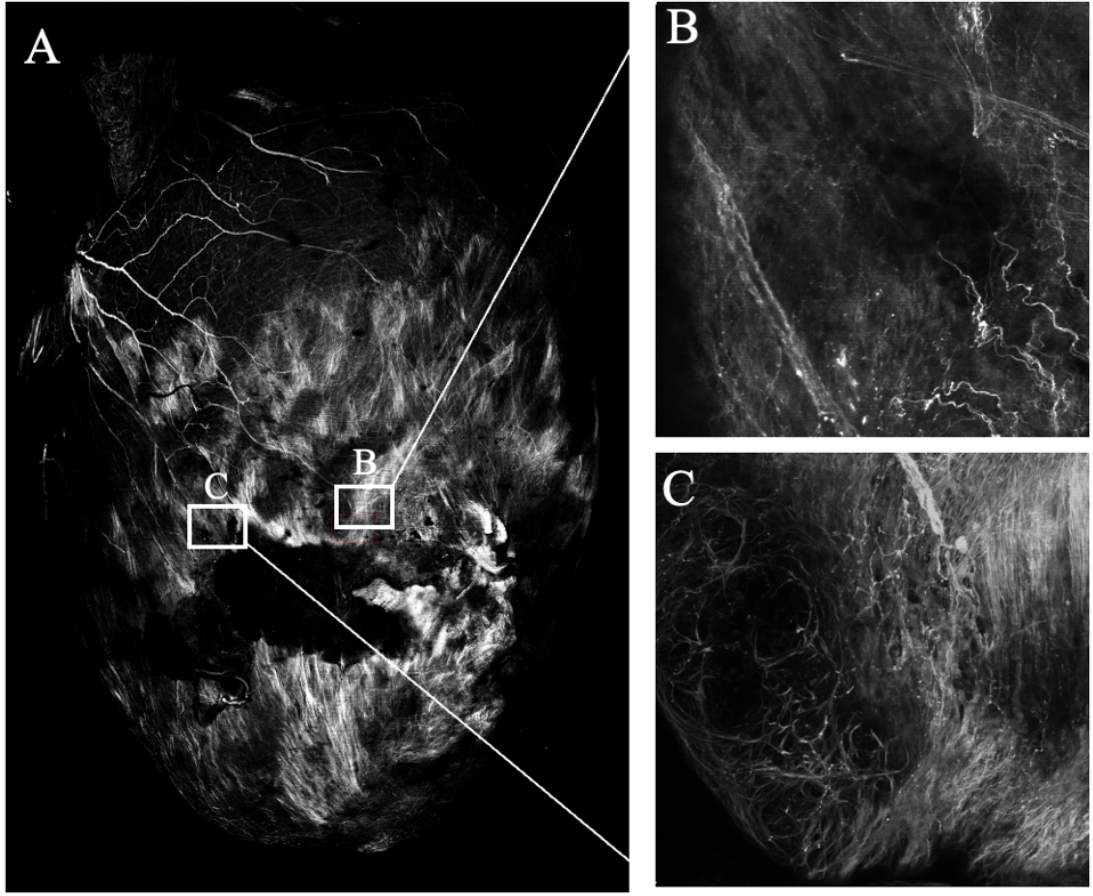


**Şekil 6.44** Farelerin elektrokardiyogramı (EKG). A. Farelerin sağlıklı durumu için başlangıç EKG kaydı ve (B) MI sonrası 5. gün ve (C) 20. Gün EKG kaydı.

Operasyon sonrasında bakımları sağlanan fareler farklı zamanlarda değerlendirilmek üzere 1, 14, 21 ve geç gün (40-45) olacak şekilde perfüze edildiler. İmmüno boyama ile elde edilen veriler doğrultusunda üç hafta sonra (21. gün) hasarlı alanda akson yenilenmesinin başladığı ve yeniden dallanmanın görüntülenebildiği tespit edildi (Şekil 6.45). Bununla birlikte bazı kalplerde MI sonrası kas hasarının oluştuğu ve arka plan sinyalinin artışı nedeni ile akson fiberlerinin görüntülenmesini imkansız kıldığı görüldü (Şekil 6.46).



**Şekil 6.45** VGLUT2::ChR2 transjenik fare kalbinde LAD bağlama ile oluşturulan miyokard infarktüsün farklı zamanlarda değerlendirilmesi. MI sonrası A. 1. gün, B. 21. gün ve C. 40. gün anti-RFP ile immüno işaretleme sonrası kalplerin 5X objektif ile görüntülenmesi. Ölçek barları 1mm'dir.

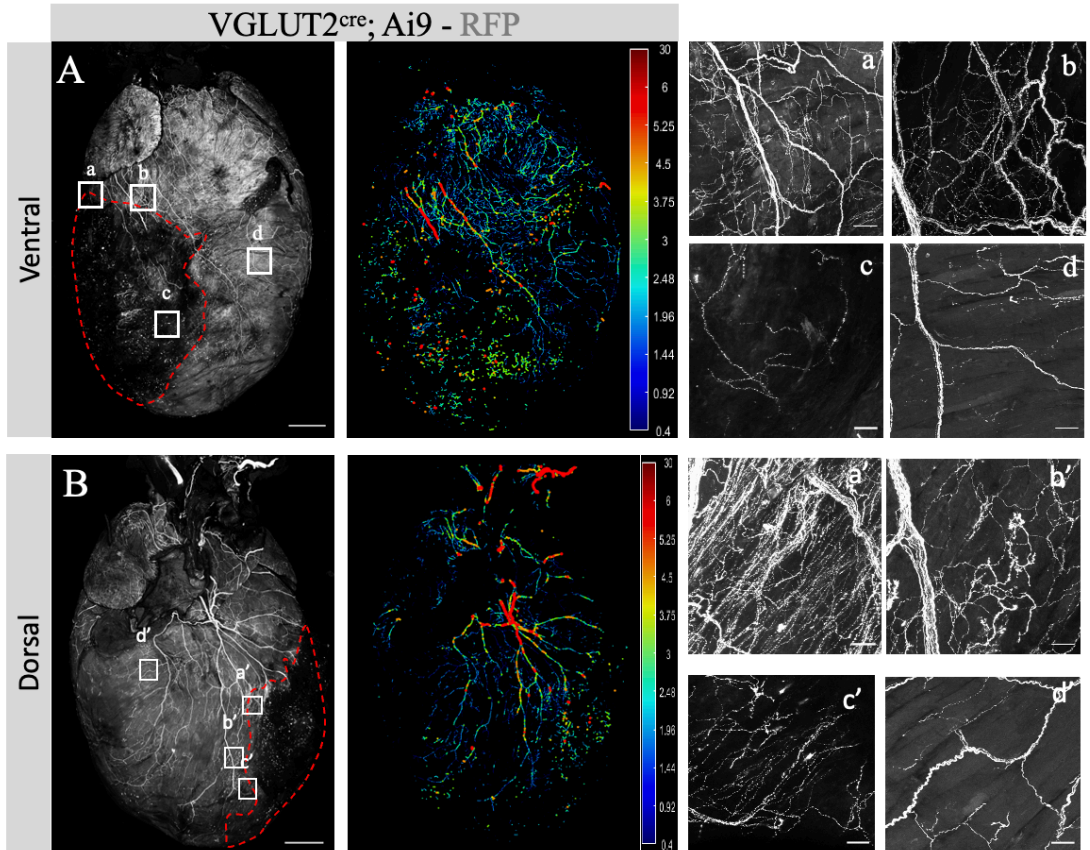


**Şekil 6.46** VGLUT2::ChR2 transgenik fare kalbinde LAD bağlama ile oluşturulan MI sonrası oluşan kas hasarının görüntülenmesi. A. MI sonrası anti-RFP ile immüno işaretlenerek 5X objektif ile görüntülenmesi. Ölçek barları 1mm'dir.

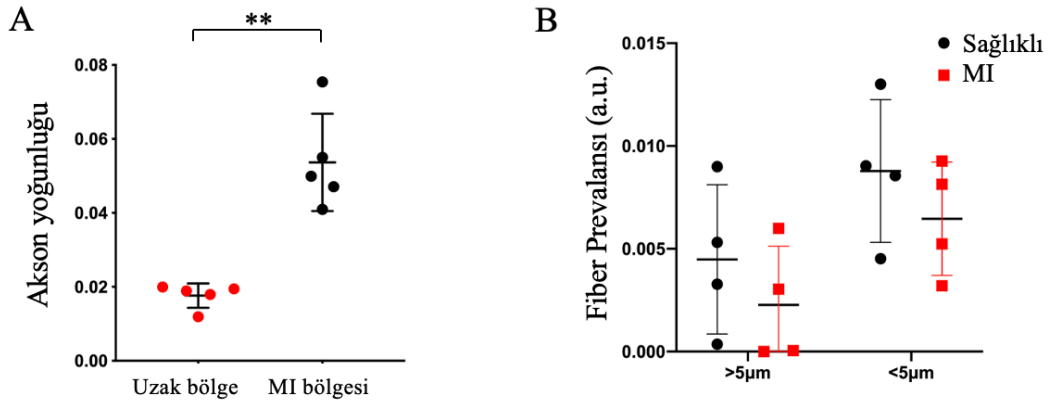
### 6.8.2 MI Sonrası Kardiyak Afferent Ağının Yeniden Modellenmesinin Görüntülenmesi

MI sonrası 21. günde perfüze edilen kalplerin 3B görüntülemesinde, sağlıklı bölgeye kıyasla miyokard bölgesinde güçlü bir otofloresan arka plan belirgin şekilde görüntüledi. VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik fare kalplerinin anti-RFP immüno işaretlenmesinden sonra skar alanında otofloresan arka planında kas dokusu kaybını gösteren keskin bir düşüş saptandı (Şekil 6.47 A). Miyokard tabakasındaki incelmeye perfüzyon sırasında solüsyonların enjektör ile damarlardan verilmesi ile kalbin şişip büzülmesi sırasında gözle anlaşılmaktadır. Bazı kalplerde incelmeye bağlı olarak incelen kas tabası şeffaf bir perde gibi görünmektedir. Skar alanı çoğunlukla ventral ve devamında dorsal yüzde olacak şekilde MI sonrası VGLUT2::tdTomato ikili

transgenik fare kalbinde görüntülendi (Şekil 6.47 A, B). Skar alan ve sınır bölgesindeki afferent ağın yapısının, aynı kalpte skar alanına uzak dokuyla karşılaştırıldığında büyük ölçüde fiber devamlılığının bozulduğu tespit edildi (Şekil 6.47 A ve B, sol panel). Görüntüler üzerinde yapılan otomatik fiber izleme analizi, VGLUT2 ifade eden kalın afferent fiberlerin devamlılığının olmadığını (Şekil 6.47 A ve B, sağ panel) ve ince fiberlerin sınır bölgesinde organize olmayan bir düzenle dağıldığını gösterdi (Şekil 6.47 a, b, a' ve b'). Hasar bölgesinin içinde nadiren ince aksonlar veya sinir uçları saptandı (Şekil 6.47 c ve c'). Ayrıca, MI bölgesine uzak sağlıklı (Şekil 6.47 d ve d') kalp dokusuna kıyasla infarktüs sınır bölgesinde (Şekil 6.47 a, b, a' ve b') afferent hiperinervasyon prevalansının önemli ölçüde arttığı gösterildi ( $p < 0.003$ ,  $n: 5$  Şekil 6.48 A). MI sonrası görüntülenen kalplerde sağlıklı kalplere kıyasla, ventral yüzde hem ince ( $< 5\mu\text{m}$ ) hem de kalın ( $> 5\mu\text{m}$ ) sinir lifleri için toplam yoğunluk prevalansı kalp genelinde bir azalma gösterdi ( $n: 4$ , Şekil 6.48 B).



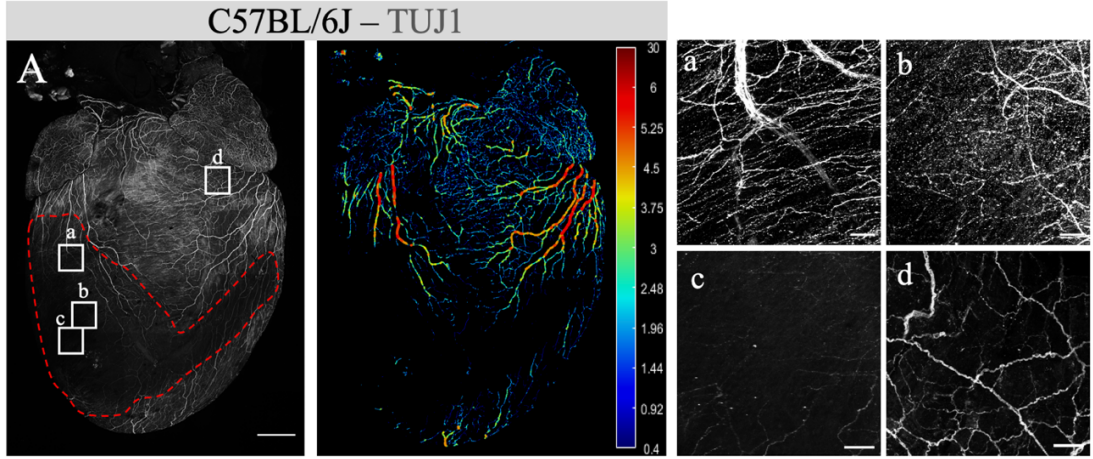
**Şekil 6.47** MI sonrası yeniden şekillenen afferentlerin görüntülenmesi. A. Ventral yöndeki ve B. dorsal yöndeki (solda) VGLUT2 eksprese eden glutamaterjik afferentlerin anti-RFP ile immünokimyasal boyama sonrası 5X objektif ile genel görünümü ve VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 fare kalbinin sinir çapı ölçümleri için (sağda) türetilmiş renk kodlu haritası; a-d. ve a'-d'. MI skar sınır bölgesi ve iskemik alan etrafındaki nöral filizlenmenin (A) ve (B)'de gösterilen kutulu alanların 20X objektif ile yakınlaştırılmış görünümü. A ve B 5X objektifle çekildi ve ölçek barları 1mm'dir. (a-d) ve (a'-d') 20X objektif ile çekildi ve ölçek barları 20 µm'dir.



**Şekil 6.48** VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik fare kalplerinin ventral yönde MI bölgesinin sağlıklı alan veya kalplerle karşılaştırmalı analizleri A. İnfarktüs alanı çevresindeki 3 bağımsız alan için sinir yoğunluğunun aynı kalpte MI bölgesinden uzak sağlıklı alan ile karşılaştırmalı ölçümü (n = 5 kalp, p= 0,003). C. Sağlıklı ve MI sonrası VGLUT2<sup>Cre</sup>;Ai9 transgenik fare kalplerinin ventral yönde çapları >5 µM ve <5 µM olan fiberlerin yoğunluğunun ölçülmesi (n = 4 kalp).

### 6.8.3 MI Sonrası Kardiyak Bütüncül Sinir Ağının Yeniden Modellenmesinin Görüntülenmesi

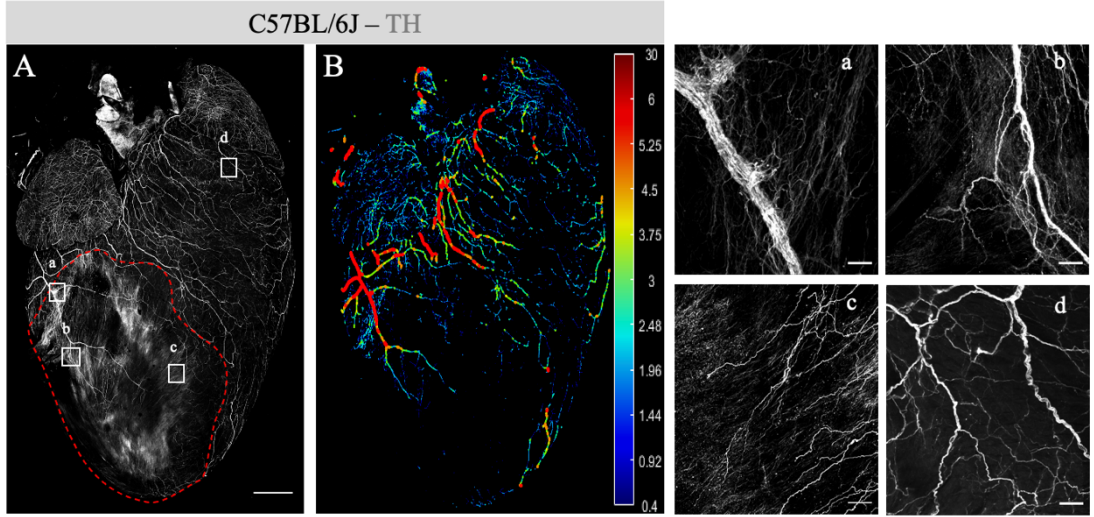
MI sonrası bütün sinir ağının görüntülenmesi için vahşi tip farelere ait kalplerin pan-nöronal markörü TUJ1 immüno işaretlenmesi ile hasar bölgesindeki sinir liflerinde afferent yenilenmesi bulgularımızla benzer olarak (Şekil 6.47) skar alanda dramatik bir azalma ve infarktüs sınır bölgesinde sinir filizlenmesinin arttığı gösterildi (Şekil 6.49). Bu gözlem, sağlıklı kalp kasına (Şekil 6.49 d) kıyasla sınır bölgesinin (Şekil 6.49 a, b) ve skar bölgesinin (Şekil 6.49 c) yüksek büyütme görüntülerinde belirgindi.



**Şekil 6.49** Ventral yüzdeki (solda) TUJ1-IR liflerinin genel görünümü ve sinir çapı ölçümleri için (sağda) türetilmiş renk kodlu harita. a-c. MI hasar sınır bölgesi ve iskemik alan etrafındaki nöral filizlenmenin yakınlaştırılmış görünümü. d. MI hasar alanına uzak bölgenin yakınlaştırılmış görünümü. Ölçek çubukları (A) için 1 mm ve 5X büyütme ile gösterilir. Ölçek çubukları, 20X büyütme ile 20 µm (a-d) olarak gösterilmektedir.

#### 6.8.4 MI Sonrası Kardiyak Sempatik Ağının Yeniden Modellenmesinin Görüntülenmesi

MI sonrası sempatik inervasyonu incelemek için anti-TH antikoru ile immüno işaretli vahşi tip kalplerde afferent yeniden şekillenme gözlemlerimizle tutarlı olarak (Şekil 6.50) sağlıklı MI bölgesine uzak dokunun aksine (Şekil 6.50 d), sınır bölgesinde noradrenerjik efferent reinervasyonu ve skar bölgesinde denervasyonu gösterildi (Şekil 6.47 a, b, c). TH-IR efferent sinirlerinin, sağlıklı kalplerdeki organize ağa kıyasla iskemik alanda organize olmayan bir dağılımının olduğu gösterildi (Şekil 6.33, Şekil 6.50).



**Şekil 6.50** MI sonrası sempatik efferent yeniden şekillenme. C57BL/6J vahşi tip kalpte ventral yüzdeki (A) TH-IR sempatik efferentlerin genel görünümü ve sinir çapı ölçümleri (B) için türetilmiş renk kodlu harita. a-d. MI skar sınır bölgesi ve iskemik alan etrafındaki nöral filizlenmenin (A)'da gösterilen kutulu alanların 20X büyütme ile yakınlaştırılmış görünümü. Ölçek çubukları, 5X büyütmede (A) ve (B) için 1 mm'yi 20X büyütmede ise 20  $\mu$ m'yi (a-d) göstermektedir.

Elde edilen veriler sonucunda, tüm inervasyon, noradrenerjik sempatik efferentler ve glutamaterjik afferentlerin, MI ile indüklenen miyokard hasarını takiben iskemik alanda majör denervasyon ve sınır bölgesinde düzensiz reinervasyon paternleri ile ciddi bir yeniden şekillenme gerçekleştiği gösterildi.

## 7. TARTIŞMA

Sağlıklı durumdaki kalbin duyuşal sinir ağı veya iskemi sonrası yeniden şekillenmesi (remodelling) tüm organ düzeyinde büyük ölçüde tanımlanmamıştır. Afferent sinir liflerini özel olarak etiketleyebilecek belirteçlerin eksikliği, kardiyak inervasyonu olan sinir liflerinin global olarak görüntülenmesini engellemiştir. CGRP veya Substance P gibi peptiderjik belirteçlerin kullanıldığı geçmiş çalışmalar kardiyak afferentlerin 3B bütüncül görüntülenmesi konusunda eksik kalmış, kısmi görüntülenmesini raporlamıştır (67,184). Bu tez çalışmasında, sağlıklı veya MI sonrası kalplerde transgenik fare modelleri ve gelişmiş görüntüleme teknikleri kullanılarak vagal ve spinal afferentlerin global mimarisinin haritasını görüntüledik. Tüm kalp preparatları, atrium ve ventriküllerdeki nöron liflerinin ve akson uçlarının immünokimyasal özelliklerini sınıflandırarak karşılaştırmalı olarak TH proteinini eksprese eden noradrenerjik sempatik efferentler ile VGLUT2 proteini ifade eden glutamaterjik afferentleri yüksek çözünürlük ve tüm kalp düzeyinde görüntüledik. Detaylı karakterizasyonumuz, farklı aksonal sonlanma morfolojilerinin olduğunu ortaya çıkardı. Atrium ve ventrikül özelinde bulunan sonlanma çeşitleri ile birlikte tek akson seviyesindeki lifler ayırt edilebildi. Kalp kasından gelen otofloresan, ince akson dallarının ve sonlanmaların saptanmasında karşılaştığımız zorluklardan biriydi. Sağlıklı ve MI sonrası genel sinir ağı, afferent ve sempatik inervasyonun yüksek çözünürlükte görüntülenebilmesi için bu tez çalışması kapsamında, çeşitli transgenik fare soylarının belirlenmesi ve immünokimyasal boyama sürecindeki optimizasyonlarla birlikte kalbin 3B dorsal ve ventral yüzlerde daha önce gösterilmeyen detay ve kapsamda görüntülenmesi sağlanmıştır.

Kardiyak afferentler, kardiyak fonksiyonu ve fizyolojik parametreler hakkında merkezi sinir sistemine ağı, basınç gibi duyuşal bilgi sağlar. Özellikle bu bilgilerin arteriyel mekanoreseptörler ve kemoreseptörler tarafından iletildiğı düşünölmektedir. Afferent sinirler vagal hat ve "sempatik" liflerle birlikte sırasıyla NG ve AKG'ye gider. İntrinsik kardiyak sinir sistemi, ekstrakardiyak intratorasik gangliyonlar, omurilik, beyin sapı ve daha yüksek merkezler (korteks gibi) dahil olmak üzere birden fazla birimde afferent bilginin işlenmesi, sonrasında ise kalbin fonksiyonunu devam ettirebilmesi için efferent kardiyomotor (sempatik ve parasempatik) sinyalleri modüle

eden birbiri ile etkileşimli geribildirim döngüleri görev alır. Kalbi inerve eden sinir sisteminin karmaşıklığı detaylı şekilde Kalbin İnervasyonunun Atlas'ı (Atlas of Cardiac Innervation) kitabında ele alınmıştır (61). Kalbin afferent inervasyonunun köken aldığı özellikle NG özelinde fonksiyonel ve yapısal bazı çalışmalar mevcuttur (28,90). VGLUT2::ChR2 transgenik farelerde vagal afferentlerin global aktivasyonunun parasempatik efferent etkisini (outflow) artırıp sempatik efferent etkisini merkezi olarak azaltması sonucu kalp atım hızını azalttığı gösterilmiştir (28). Npy2r-ChR2 transgenik farelerde ise vagal afferentlerin seçici aktivasyonunun bradikardiye sebep olduğu gösterilmiştir (90).

Anatomik izleme (tracing) çalışmaları, nodoz/juguler ganglion kompleksindeki kardiyak vagal afferent nöronların medullanın traktus solitarii çekirdeğindeki nöronlara yansıdığını göstermiştir (185). Vagal afferentlerin daha sonra parasempatik efferent çıkışını modüle etmek için ambiguus nükleus ve medulladaki DMV'ye, sempatik efferent çıkışını modüle etmek için hipotalamusun paraventriküler çekirdeğine sinaps yaptığı bilinmektedir (185,186). Spinal ve vagal kökenli afferentleri işaretlemeye ve fonksiyonlarını anlamada kullandığımız VGLUT2-Cre trans geninin DMV nöronlarında ifade edilmediğini bildiren çalışmalar mevcuttur (71,72,177,178). VGLUT2-Cre transgenik fare soyuna ilişkin nicel karakterizasyon yapılırken, DMV nöronlarında VGLUT2-Cre yönlendirmeli eYFP ifadesinin olmadığını gösteren Tanaka ve grubunun çalışmasının yanı sıra Cheng ve ekibi ise DMV'de saydıkları 845 nörondan sadece 6 tanesinin pozitiflik gösterdi. (72,187). Ancak DMV'den sadece kalbe değil, diğer iç organlara da (mide, ince bağırsak, proksimal kolon, karaciğer, pankreas, dalak, kalp, akciğerler) projeksiyonların olması pozitif nöronların kalbe inervasyonunun ihmal edilebilir seviyede olduğunu kuvvetlendirmektedir (188).

Kalbi inerve eden afferentlerin spinal ve vagal ayrımlarının gerçekleştirilmesi ancak işaretleyici retrograd ilerleyen boya veya virüsler ile yapılabilmektedir. C4-T8 aralığında geniş bir segment AKG'lerin ve NG'deki hücre gövdelerinin işaretlenmesi ile kalbin afferent inervasyonunun moleküler karakterizasyonu yapılmaya başlanmıştır (12). RNA sekanslama tekniği ile işaretlenen AKG ve NG nöronlarının genel popülasyondan anlamlı olarak farklı ifade edilerek ayrıştırılan genlerin



belirlenmesi sonucunda AKG ve NG özelinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamız bu açıdan önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında 3B afferent inervasyon paterninin görüntülenmesi ve kalp fonksiyonuna etkisinin araştırılması gerçekleştirilirken yalnızca spinal kökenli afferentlerin işaretlenebilmesi ise transkriptom verisinden belirlenen genlere ait transgenik fareler kullanılarak oluşturulmaya çalışıldı.

Antikor temelli yaklaşımların, protein temelli oluşları nedeni ile akson işaretleme açısından doğal sınırlamaları vardır. Özellikle transkripsiyon faktörü olan VGLUT2'nin aynı proteini işaretleyen antikorların bağlanma kapasitelerinin perifer ve merkezi sinir sisteminde farklı olması, aksonların detaylı haritalamasının immünokimyasal yöntem ile gerçekleştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu tez çalışmasına başlarken ana planlarımızdan biri afferent, sempatik ve parasempatik efferentlerin haritasının aynı kalpte görüntülenmesini sağlamaktı. Ancak teknik olarak karşılaştığımız 1. antikorların bir arada etkili şekilde çalışmaması, 2. parasempatik efferentleri işaretlemede kullanılan CHAT antikorunun MSS'de çalışıp PSS'de çalışmaması, 3. sempatik efferentlerin görüntülenmesinde kullanmayı hedeflediğimiz TH-Cre transgenik fare soyunun ilk jenerasyon üretiminden kaynaklanan genotipte TH ifade edip, fenotipte inervasyonlarda gösterilememesi nedeni ile planladığımız dört farklı antikor boyamasını gerçekleştiremedik. Birincil antikor ve ikincil antikor bağlanmasının spesifikliğini arttırmak için öncelikle konjuge antikorlar ile boyama işlemleri gerçekleştirdik. Ancak kalbin kas yapısından kaynaklanan arka plan otofloresansı nedeni ile sinir aksonları görüntülenemedi. Görüntüleme optimizasyonları kapsamında iDISCO (158) ve CUBIC (162) gibi hidrofobik ve hidrofilik bazlı doku temizleme teknikleri kullanıldı. Bu teknikler çoğunlukla beyin gibi yağ dokusunca zengin organlarda etkin sonuçlar sağlarken, kas açısından zengin olan kalp gibi organlarda ise arka plan otofloresan görüntüsünü arttırdığını tespit ettik (189) (Şekil 6.19 ve Şekil 6.20). Tüm şeffaflaştırma protokolleri organları oluşturan temel dokunun detaylı bir şekilde görüntülenebilmesini hedeflemektedir ve bunun için geliştirilmiştir. Özellikle lipid içeriği yüksek organların, başta beyin ve omurilik kordonu olmak üzere, transparan hale getirilip sinir ağının kapsamlı görüntülenmesi için kullanılmaktadır (154). Yoğun kas dokusu içeren kalp vb. organların şeffaflaştırıldığı çalışmalarda ise kas liflerinin derinlikli bir şekilde görüntülenmesine odaklanılmıştır (190). Dolayısıyla kalp ve iskelet kası şeffaflaştığında oluşan otofloresan sinyal sarkomer yapılarının

ayrıştırılmasını kolaylaştırmıştır. Bizim çalışmamız ise kalbi saran ve kalp kasını inerve eden duyu sinir ağını görüntüleme ve haritalamayı hedeflemektedir. Dolayısıyla şeffaflaşma sonucu kas dokusunda artan otoflorasan sinyal, sinir ağından gelen antikör kaynaklı florasan sinyali bastırarak tetkik edilmesini engellemiştir. Kalp dokusunun tek hücre seviyesinde görüntülenmesini sağlayan SUT (Scheme Update on tissue Transparency) gibi yeni teknikler geliştirilmiştir (191). Araştırmacılar SUT yöntemi ile şeffaflaşma sonrası kardiyak Troponin I, kollajen I, alfa tubulin gibi antikörlerle yapılan immüno boyama işlemi yaparak kalbi oluşturan hücrelerin görüntülenebilmesi sağlamıştır (191). Ancak bu çalışma kalbi oluşturan hücrelerin görüntülenmesine odaklandığı için bu yöntem de kalbe inerve eden fiberlerin görüntülenmesine olanak sağlamaktan uzaktır.

İmmün boyama ve doku temizleme-şeffaflaşma yöntemlerinin kalbi inerve eden fiberlerin global görüntülenmesinde yeterli olmaması nedeni ile transgenik fare yaklaşımı ile immüno işaretleme tekniklerini bir arada kullandık. Literatürde, transgenik fare çalışmalarında, nöral krest hücrelerinden türetilen dokuları tanımlamak için Wnt1-Cre rekombinaz (Cre) fareleri, tdTomato raportör proteinini ifade eden farelerle çaprazlanarak kullanılmıştır. Wnt1::tdTomato farelerin kalpleri, epifloresan stereomikroskopi kullanılarak görüntülenen kırmızı floresan ile etiketlenmiş ve nöral orijinden köken alan hücreler oldukları ve subepikardiyal sinir ağını ayrıntılarıyla görüntülediğini gösterdi (192). Tez çalışmasında kullanılan LSM880 konfokal mikroskobu kullanılarak elde edilen görüntü derinliği absorpsiyon nedeniyle, görüntü alımını yüzeysel doku katmanlarıyla sınırlandırmaktadır. Gelecekteki doku temizlemede yapılacak teknik yenilikler ve bu sınırlamaların bazılarının üstesinden gelebilir.

Şeffaflaşma uygulamadan, vagal ve spinal kökenli duyu nöron aksonlarının kalpteki inervasyonunu yüksek çözünürlükte görüntüleyebilmek amacıyla sinyal-gürültü oranının yükseltilmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla standart ikincil antikörlere göre sinyal-gürültü oranı en az 4 kat daha yüksek olan Alexa Fluor-PLUS antikörlere tercih edildi. Fare kalbindeki tüm afferent liflere moleküler erişim sağlamak için immünokimyasal olarak boyama tekniği ile desteklediğimiz Cre-loxP transgenik stratejisi kullandık. Periferik duyu sinirlerinin glutamaterjik kimliğinden yararlanarak,

VGLUT2 genetik lokusları tarafından kontrol edilen Cre rekombinaz aktivitesinin, spinal ve vagal bileşenleri kapsayan kalbin tüm afferent liflerinde tdTomato floresan proteininin ifade edildiğini gösterdik. Bu nedenle, bu yaklaşım bize sağlıklı ve infarktüs koşulları altında kalbin duyuşal sinir yapısında meydana gelen değişikliklerini araştırmak için görüntüleme imkanı sağladı. Kalbin dorsal ve ventral yüzünün 3B olarak görüntülenmesi bize inervasyon paterninin değerlendirilmesi hususunda yardımcı oldu. Yaptığımız çoklu görüntülemeler sonucunda kalbin dorsal yüzde ventral yüzüne oranla daha yoğun fiber olduğunu literatürde yapılan çalışmalara paralel olacak şekilde tespit ettik (28,59,131). Kalbin global inervasyonunun görüntülenmesi için TUJ1 antikorunu ve VGLUT2::tdTomato transgenik fare kalplerini kullanarak endojen floresan sinyali olan tdTomato'nun anti-RFP kullanılarak artırılması ile yaptığımız immüno işaretlemelerde direkt antikor kullanımı ve endojen sinyalin artırılması gibi iki ayrı yöntem olmasına rağmen benzer sonuçlar elde ettik. Çok sayıda transgenik ve vahşi tip fare kalbinde yaptığımız immüno işaretlemeler sonrası görüntülemelerde birebir aynı inervasyon paternlerinin olmadığını gördük. Damar yapısı ile sinir fiberlerinin birlikte konumlanmış olması nedeni ile kalbi besleyen koroner arterlerin pozisyonlarındaki çeşitliliğe benzer bir durum olduğunu göstermektedir. Aynı kalpte parasempatik ve duyuşal sinir ağlarının birlikte haritalanması anti-CHAT antikorlarının periferde çalışmaması nedeniyle sınırlandırılmıştır. Bu sınırlamayı aşmak için tüm kalp seviyesinde kardiyak inervasyonu tespit etmek için çeşitli antikorlar test ettik ve ancak spesifik bir sinyal veren antikor tespit edilemediğinden parasempatik ve duyuşal haritalama birlikte yapılamadan çalışmalarımıza devam ettik. Yeni moleküler araçların veya transgenik modellerin geliştirilmesiyle, gelecekteki çalışmalar eksik kalan otonomik inervasyonu kapsayacak şekilde genişletilebilir.

Görüntüleme tekniği varyasyonlarını egale etmek için kalbin pozisyonel doğruluğu sağlandıktan sonra elde edilen veriler kullanılarak, ventral ve dorsal yönlerdeki sinyal yoğunluğu ile birlikte aksonların çapları değerlendirmeye alındı. İmmüno işaretlemeye dayalı yapılan bu tez çalışması kapsamında kalpten kalbe varyasyonların olması göz önünde bulundurularak optimize edilen yöntem bütün kalplere benzer şekilde uygulandı. 3B haritanın 5X objektif yardımı ile alınıp kalbin çeşitli bölgelerinin 20X ve 40X objektiflerle yapılan çekimleri ile detaylı bilgiler

edindik. Kalbin atriyum ve ventriküllerinin detaylı çekimleri ile global haritaya ek olarak ayrıntılı sinir sonlanmaları ve uç morfolojileri kapsamlı olarak görüntülendi. Kalp boyunca atriyumlarda belirgin şekilde yoğun olan ancak yakın büyütmede dikkatli bakıldığında az da olsa ventriküllerde de bulunan dalgalı sinir lifleri tespit edildi. Özellikle inferiyor kavo-atrial bağlantı noktasında (inferior cavo-atrial junction) dalgalı fiber yapısının CGRP-IR ve TH-IR oldukları ve kan akış yönünde kan damarlarının çevresinde lokalize oldukları gösterilmiştir (26). Tespit ettiğimiz afferent aksonal uçların belirli bir yerde kümelenmeyip, kalp boyunca farklı bölgelerde bulduklarını gösterdik. Aksonal sonlanma morfolojileri için, kalbin hem dorsal hem de ventral yüzlerde kulakçıklarda ve karıncıklarda çiçek sprej uçları tespit ettik. Özellikle, kalbin üst bölümünde bulunan pulmoner arter ve koroner arter üzerinde, etrafında çiçek benzeri sinir sonlanmaları gözlemledik. Bulgularımıza göre çiçek benzeri sinir sonlanmaları boyut ve yoğunluk açısından farklılık göstermektedir (181). Daha önce, mekanosensör ve baroreseptör aktivitesi olduğu düşünülen çiçek sprej terminallerinin kısmen aortik ark inervasyonunda (17,193), (26) ve ventriküler endokardiyumda (15) varlıkları gösterilmiştir. Ayrıca, mekanoreseptör ve baroreseptör özelliği gösteren terminallerin dallanma tipi uç ağlar formunda olduğu gösterilmişken (194), uç ağ sonlanmalarının yoğun olarak üst ve alt kavo-atriyal bölgelerde olduğu bulgular arasındadır (15,26). VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9 transgenik fare kalplerinde yapılan detaylı görüntülemelerde dallanma tipi uç ağ sonlanmalarının ventriküllere kıyasla çoğunlukla atriyumlarda olduğu, serbest tek akson sinir uçları ve çiçek benzeri sonlanmaların önceki raporlarla tutarlı şekilde hem atriyumlar hem de ventriküllerde olduğu gözlemlendi (18,26,181). Ayrıca, ventriküllerde görüntülediğimiz kardiomyositlerle paralel şekilde hizalanmış kas içi sonlanma tipini atriyumlarda tespit edemedik. Verilerimiz, muhtemelen atriyumlara kıyasla daha güçlü kasılma aktivitesi ile ilişkili ventriküllerdeki daha yüksek kalp kası lifi içeriğinden dolayı ventriküllerde seçici olarak kardiyak miyofibrillerle intramüsküler dizi sinir uçlarının hizalandığını gösterdi.

Afferent sonlanma tipleri özellikle kolon ve ince barsaklarda detaylıca çalışılmıştır (3,14). Gastrointestinal yolu besleyen vagal ve spinal afferentler, kısmen periferik uçların uyarıcı tepki özelliklerini belirleyen terminal inervasyon modellerinde de farklılık gösterir. Vagal afferentler, lümen emilen kimyasallara

(örneğin besinler) veya enteroendokrin hücrelerden veya lamina propriadaki immün hücrelerden salınan araçılara maruz kaldıkları mukozal epitelin yakınında sonlanır. Vagal afferentler ayrıca mekanik aktiviteyi saptadığı düşünülen intramüsküler diziler ve intraganglionik laminer uçlar oluştururlar. Spinal afferentler ise mukoza, submukoza ve myenterik pleksusa inerve olurlar. Ek olarak, AKG nöronlarının projeksiyonları, genellikle kan damarlarıyla bağlantılı olarak mezenterik bağlantılarda sonlandığı görülmüştür.. Bu sonlanmalar moleküler düzeyde bu mekanoreseptör mekanizmasının moleküler temeli bilinmemesine rağmen mekanik duyarlıdır. Hem vagal hem de spinal afferentler, distansiyon ve kasılmaya yanıt verir, ancak vagal afferent uçlar, normal sindirim süreci sırasında meydana gelen gerilme seviyelerine yanıt verirken, birçok spinal afferent, insanlarda rahatsızlık veya ağrıya yol açan uyarılara karşı aktivasyon eşiklerine sahiptir (195).

Tirozin hidroksilaz (TH), kalpte katekolamin salan sempatik motor liflerinde ifade edilir (196). VGLUT2<sup>Cre</sup>; Ai9 transgenik fare kalbinde yaptığımız analizlerde aksonların hem TH hem de RFP için immün reaktivite göstermediğini ve bu nöronların bifenotipik yapıya sahip olmadığını tespit ettik. İmmünokimyasal olarak farklı TH veya VGULT2 ekspres eden aksonların terminallerine kadar aynı fiber içerisinde birbirleriyle yakın bir şekilde ilerlediğini, sonlanma noktalarının farklı olduğunu görüntüledik. Özellikle ayrıştıkları noktalarda çok sayıda varikoz oluşturdukları belirlendi (197). Terminallerde, TH-IR veya RFP-IR aksonları genellikle epikardiyumda dallanmış olduğunu, burada RFP-IR aksonlarının miyofibriller ile etkileşime giren çiçek benzeri sonlanma gerçekleştirdiklerini gösterdik. Afferentlerde tespit ettiğimiz çiçek benzeri sonlanma motiflerinin literatürde gösterildiği gibi kalbin kasılması ile ilgili baroreseptör veya mekanoreseptör olabileceklerini düşündürdü (17). VGLUT2 bildiren RFP sinyali ve TH-IR sinirlerinin ne nöron somatasında ne de sinir terminallerinde birlikte ifade edilmediği, kalp üzerinde yapısal ve işlevsel olarak farklı desenlere sahip afferent ve efferent inervasyonu olduğunu, farklı lif yoğunlukları sergilediğini gözlemledik.

Kardiyak sempatik sinir yoğunluğu, miyokardın sempatik sinir aktivitesine verdiği fonksiyonel yanıtın önemli bir belirleyicisidir. Kalp kasındaki sempatik inervasyonu ölçmek için geleneksel yöntemler genellikle gömme ve mekanik

kesitlemeyi (138,198) veya dehidrasyon ve ısıtmayı (25,199) içerir. Bu tür teknikler, bozulmamış sistemde ortaya çıkanla karşılaştırıldığında doku mikro-morfolojisini belirgin şekilde bozabilir. Burada sunduğumuz yöntem, kimyasallarla minimal etkileşimde bulunmuş, yani korunmuş üç boyutlu yapı koşulları altında, sempatik aksonların yoğunluğu nicelleştirilmesine izin verir. Anatomik innervasyon yoğunluğu ve nöronal fonksiyon arasındaki korelasyonun kurulmamış olmasına rağmen tekniğimiz ile sağladığımız yüksek çözünürlük sayesinde toplam akson uzunluğunun hesaplanabileceği ve kalpteki sempatik nörotransitörün salımı miktarı ile ne ölçüde ilişkili olduğu araştırılmalıdır.

Memelilerde, IKG'ların çoğu, özellikle yağ dokusuna gömülü olan epikardiyal kalp hilusuna dağılmıştır (200–202). Her iki atriyumda da kardiyak gangliyonlar farklı şekil ve boyutlarda bulunmaktadır (184). Domuz yavrularının (203), tavşanların (201) ve insanların (204,205) kalplerinde çoğunlukla koroner oluğa yakın bölgelerde (204,206) ve kısmen de olsa ventriküllerde kardiyak gangliyonların belirlendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Farelerde, bizim bulgularımız ile uyumlu olarak sadece atriyum ve aortik arkta gangliyonlu pleksus saptandı (200). Genel olarak MSS'de nöronların çoğunluğu ya parasempatik ya da sempatik karaktere sahip iken, intrakardiyak sinirler sadece parasempatik ya da sempatik değil, bazı hücre gövdeleri iki nöron tipi için de belirteçleri gösterebilmektedirler. Bu nedenle, ek belirteçlerin kullanımı, kalpteki intrinsik kardiyak nöronların ve sinirlerin karışık kolinerjik ve adrenerjik fenotipinin aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. Hoard ve grubu TH, dopamin  $\beta$ -hidroksilaz ve norepinefrin taşıyıcı ile ilişkili, ancak veziküler monoamin taşıyıcı tip 2 (VMAT2) içermeyen ve bu nedenle norepinefrin depolama yeteneği olmayan IKG'larda kolinerjik nöronların varlığını göstermiştir (100). İntrinsik kardiyak nöronların %83'ünün sadece ChAT-IR olduğunu, %4'ünün sadece TH-IR olduğunu ve %14'ünün hem ChAT hem de TH için immünoaktif olduğu gösterilmiştir (67). Ayrıca, intrinsik kardiyak sinir sistemindeki afferent nöron popülasyonunu tanımlamak için nosiseptif nöronlarda bulunan CGRP ve SP nöropeptitler için immünoreaktivite gösteren hücreler de aynı çalışmada belirlenmiştir (67). İntrinsik kardiyak gangliyonlu pleksusların, üç alt tipi içeren karmaşık nöron ağları ve birbirine bağlanan sinirler içerdiği bilinmektedir: i) afferent nöronlar; ii) motor (parasempatik ve sempatik) nöronlar; ve iii) yerel devre nöronlarını birbirine

bağlayan alt gruplar (76). Bu bilgiler ışığında, kalp seviyesindeki bu sinir ağının, kardiyak refleksi modüle etmede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Afferentlerin belirlenmesinde kullanılan VGLUT2-Cre transgenik faresinde görüntülenen nöron lifleri, domuz kalplerinde çalışılmış önceki raporlara benzer şekilde, herhangi bir soma etiketlemeden yalnızca fare kardiyak ganglionlarında tespit edildi (184). Bulgularımızda, görüntüleyebildiğimiz IKG'lar içindeki nöral somada TH-IR tespit etmemize rağmen, nöron somaları arasında VGLUT2 eksprese eden RFP-IR gövdeler saptanmadı, ancak sadece intrinsik gangliyonlardan TH-IR nöron somalarından geçen veya etrafından dönen afferent aksonlar tespit edildi. Gangliyonları oluşturan somaların içerisinden geçen veya çevresini saran afferent fiberlerin varlığı kalbin elektriksel iletiminde afferentlerin dengenin sağlanmasında işlevsel bir rolünün olabileceğini göstermektedir.

Total afferentler arasından spinal afferentlerin görüntülenmesi ve fonksiyonlarının araştırılması için ticari olarak temin ettiğimiz transgenik fareler loxP-tdTomato farelerle çaprazlanarak ikili transgenik fareler elde edildi. Yaptığımız görüntülemelerde 3B spinal afferent haritalar elde edilemedi. Mrgpr'ler AKG ve trigeminal gangliyonların somatosensoryel iletili nöronlar, nosiseptif ve pruriseptif nöronlarında ve daha spesifik olarak izolektin B4-pozitif küçük çaplı hücre gövdelerinde ekspresyonlarını ortaya çıkaran transkriptomik çalışmalar mevcuttur (77,207). Bazı Mrgpr'ler o zamandan beri farelerde belirli duyu nöron alt kümelerinin hakim belirteçleri olarak kabul edilmektedir. Gerçekten de, büyük ölçekli tek hücreli RNA dizilimi çalışmaları, spesifik Mrgpr'lerin ekspresyonu ile karakterize edilen duyu nöronlarının alt kümelerinin tanımlanmasını sağladı: peptiderjik olmayan (NP) popülasyon 1 çoğunlukla MrgprD'yi ifade ederken, NP2, MrgprA3 ve MrgprC11'i eksprese ettiği gösterildi (208). Bununla birlikte, diğer çalışmalar, Mrgpr ekspresyonunun duyu nöronlarla sınırlı olmadığını ve kalp (MrgprH) (209), serebral korteks ve hipokampus (MrgprE), düz kas içeren dokular (MrgprF), MrgprE ve MrgprF) (210), enterik sinir sisteminde (MrgprD) (211), beyincik gibi diğer dokularda da bulunabileceğini göstermiştir. Yüksek derecede innerve olmuş dokuların yanı sıra, immün hücreler de Mrgpr eksprese eden hücreler olarak listelenir (212). Çalışmalarımızda kalbin yüzeyinde MrgprD bağımlı tdTomato ifadesini görmemizi sağlayan ve bu nedenle afferentleri bütüncül olarak görüntülememizi engelleyen,

Mrgprd proteininin kalp kası hücrelerinde veya kalpte bulunan immün hücrelerde ifade edilmesi olabilir. Spinal afferentlerin görüntülenmesinde kullanılan bir diğer transgenik olan Pvalb-cre::tdTomato faresinin kalp yüzeyi görüntülendiğinde Pvalb yüksek afiniteli bir  $Ca^{2+}$  bağlayıcılığı protein olması nedeni ile kardiyomiyositlerde de ifade edilebileceği afferentler dışında kardiyomiyositlerin de floresan sinyal vermesi ile düşünüldü. Parvalbüminin atriyal ve ventriküler kardiyomiyositlerde, SA düğümünde ve AV düğümünde bulunduğu sıçan kalbinde yapılan immüno işaretleme yöntemleri ile gösterilmiştir (213). İskelet kası dışında kalp kasında da Pvalb protein varlığı nedeniyle kalp arka plan sinyal yoğunluğu fiberlerin görüntülenmesine engel teşkil etmektedir. VGLUT3-cre transgenik fare kalbinin yüzeyinde belirlenen uzantıları bulunan telosit benzeri hücre tiplerinin GFAP ve NG2 pozitif hücreler olabileceği ve yapılacak çalışmalarla kalbin elektriksel aktivitesine etkisinin gösterilebileceği gelecek planlarımız arasındadır.

Bu çalışma, iskemi veya kardiyomiyopatiden kaynaklanan miyokard hasarından sonra ventriküllerdeki sinir liflerinin dağılımının değiştiğini sempatik ve afferent özelinde yüksek çözünürlükte elde edilen görüntüleri göstermektedir. Afferent inervasyonun sağlıklı kalplerde detaylı görüntülenmesi sonrası miyokardial infarktüs durumundaki şekillenmesi hakkında bilgi edinmek için benzer yöntemle MI'lı durumun 3B ve detaylı çekimleri gerçekleştirildi. Sağlıklı farelerin kalbe dallanan duyu nöronlarının belirlenmesi MI sonrası kalpte oluşan hasarlı bölgede oluşan sinir ağı hasarının kalbin işlev bozukluğuna olan etkisinin anlaşılmasında oldukça önemli olacaktır. MI sonrası nöral yenilenme, sempatik aşırı deşarj ve azalmış vagal tonus olarak kendini gösteren otonomik dengesizlik nedeniyle kardiyak disfonksiyona büyük etkisi vardır. Nekrotik miyokard denervasyon ile ilişkilendirilmişken, miyokardiyal hasar bölgesinin periferleri ve perivasküler bölgeler zengin bir şekilde inerve edilir (148,214). Sağlıklı kalp ile kıyaslandığında bölgesel hiperinnervasyon miyokard hasarı ile ilişkilidir. Miyokardiyal iskeminin hayvan modelleri, hasarlı miyokardın sınırlarındaki sinir liflerindeki artışın, Schwann hücrelerinin ve aksonların proliferatif rejenerasyonundan kaynaklandığını göstermiştir (215). MI sonrası sempatik sinir hiperinnervasyonu daha önce bildirilmiş olmasına rağmen afferentler hakkında çalışmalar yoktur (150). Post MI, afferent ve efferent yenilenmesinin (re-inervasyonun) detaylı tanımlanması klinikte yeni uygulamaların geliştirilmesine



olanak sağlayabilir. Son yıllarda, MI sonrası gelişen aritmilerin klinik yönetiminde nöral stimülasyon ve sinir ablasyon terapileri yapılmaktadır (149), Torasik segmentlerde AKG'lerin omurilik stimülasyonu, parasempatik refleks için vagusun ve sempatik refleks için omuriliğin elektriksel nöromodülasyonu, hayvan modellerinde ventriküler aritmeyi kontrol etmek için denenmekte ve klinikte umut verici sonuçlar olabileceği düşünülmektedir (24,145,216). Bu stratejilerin geliştirilmesi, kardiyak efferentlerin ve iskemik kardiyak hasar sonrası memeli kalplerinde daha az çalışılan afferentlerin histolojik ve fonksiyonel karakterizasyonunu önemli kılmaktadır (8).

Her ne kadar motor kardiyak inervasyonu, transgenik stratejilerin kullanılmasıyla ve sempatik lifler için TH immüno-etiketleme veya parasempatik lifler için Chat immüno-etiketleme ile bir dereceye kadar ortaya çıkarılsa da, kalbin duysal inervasyonu bu tez çalışmasına kadar MI sonrası tüm organ seviyesinde haritalanmadı. Bulgularımız, sağlıklı ve MI sonrası kalplerin genel, adrenerjik ve glutamaterjik nöronların karşılaştırmalı dağılımını gösterdi. MI sınır bölgesinde, noradrenerjik yeniden şekillenme sürecinin göstergesi olan TH-IR sinirsel filizlenmenin olduğunu tespit ettik (147,150). Daha önce kardiyak efferentler için tarif edildiği gibi, kardiyak inervasyonun çoğunluğunun iskemik bölge içerisinde azaldığı bulgularımız arasındadır (150). Spesifik olarak, MI sınır bölgesi ve çevresinde afferent nöral filizlenme ve hiperinervasyonu gösterdik. Hem sınır bölgesinde hem de skar bölgesinde belirgin sinir uçları tespit edemedik. Bu nedenle, bulgularımızla göstermiş olduğumuz MI sonrası afferent ve efferent kardiyak inervasyonun yeniden şekillenmesi, muhtemelen kalp yetmezliğine veya ani kardiyak ölüme yol açan artmış bir kardiyak aritmi riskine işaret edebilir (145,146,150,217). Sonuç olarak, kardiyak duysal nöral yeniden şekillenme, MI sonrası patolojilerin önemli bir bileşeni olabilir. MI sonrası kardiyak duysal ve sempatik inervasyondaki değişiklikleri belirlemek, afferentler ve efferentler arasındaki fonksiyonel geri besleme döngülerinin düzensizliğindeki ilişki düzeyini anlamak için kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda MI sonrası sempatik ve duysal inervasyonun haritalanması patolojik mekanizmanın çözülmesine ışık tutacaktır. Kalpte MI sonrası afferentlerin baskılanmasının ya da aktif hale getirilmesinin post-iskemik kalp yeniden modellenmesi üzerine etkisi henüz çalışılmamıştır. İskeminin gerçekleştiği bölgede bulunan afferentlerin iskemi sonrası uyarılma özelliklerinin (sensitizasyon) değişebileceği düşünülmüştür.

Ek olarak iskemik hasar sonrası özellikle mikroskopik çekimlerimizde otofloresan olarak tespit ettiğimiz kalp kasında meydana gelen değişiklikler de görüntülendi (Şekil 6.43). Görelık ve meslektaşları, Taramalı İyon İletkenlik Mikroskobu (Scanning Ion Conductance Microscopy) kullanarak, kardiyomiyositlerde meydana gelen yapısal değişikliklerin, yani membran T-tübüllerinin kaybının bir sonucu olarak cAMP düzenlemesinde submikroskopik değişikliklerin hasara maruz kalan kalp hücrelerinde meydana geldiğini belirlediler (218). Yapılan çalışmada sağlıklı kalpteki miyokard yüzeyindeki kardiyomiyositlerin dış yüzey yapısı (Z-oluklar ve tepeler) ve iç túbüller ağının sağlam olduğu görülürken MI sonrası 4 hafta ve 8 hafta sonrasında CM yüzey elemanları, T-túbül yapısı ve yoğunluğunun azalmasıyla süre uzadıkça bozulmanın arttığı gösterilmiştir (219).

Çok yakın zamana kadar yüksek çözünürlüklü mikroskopik çalışmalar için teknolojinin eksikliği ve çok büyük görüntü veri kümelerini işleme yöntemlerinin olmaması kalbin genel inervasyon haritasının çıkarılmasını kısıtlamıştır. Bu nedenle anatomik olarak kalbin bölgesel görüntülenmesi araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir (107,200,201). Görüntülerde nöronal izleme ve üç boyutlu yeniden yapılandırma için biyoinformatik araçların ancak son zamanlarda geliştirilmesi ile inervasyon paterni hakkında genel bilgi sahibi olmaktayız (28). Doku görüntüleme tekniklerinin iyileştirilmesi ile kalpteki nöronal ağın yüksek çözünürlüklü görüntüsünün elde edilmesi nöral izleme uygulamalarının kullanımını kolaylaştırmaktadır. Son olarak, anatomik ve fonksiyonel verilerin entegre edilmesi, hastalık nedeniyle inervasyondaki değişiklikleri (nöral yeniden şekillenme) tam olarak tanımlamak ve nöromodülasyon için yeni veya önceden var olan yöntemlerin doğru kullanımını ve izlenmesini sağlamak için gereken çerçeveyi sağlayacaktır.

Genel olarak, burada sunulan yaklaşımı kullanarak elde ettiğimiz afferent ve sempatik mimarinin 3B yapısı ve MI sonrası rekonstrüksiyonunun, ağın elektriksel davranışının teorik analizlerini ve ağ yapısının hedef doku fonksiyonu üzerindeki etkisinin deneysel olarak değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Sağlıklı ve MI durumlarında nöro-kardiyak eşleşmeyi anlamamıza yapacağı katkı açısından bu çalışmanın verileri önemlidir.

## 8. SONUÇ

Sonuç olarak, transgenik yaklaşım kullanarak sağlıklı ve iskemik kardiyak hasarını takiben tüm fare kalplerinin dorsal ve ventral yüzlerinde VGLUT2 ekspresyon eden afferent inervasyonu 3B olarak görüntülendi. Atrium ve ventriküllerde bulunan çiçek benzeri sonlanmalar, serbest sinir uçları ve kas içi dizilimler gibi farklı sonlanma morfolojileri yüksek çözünürlükle görüntülendi. Transgenik yaklaşım ve immünoyolojik boyama yöntemlerini kullanarak ileri görüntüleme tekniklerinden elde ettiğimiz kalbin afferent inervasyonunun global seviyede görüntüleri literatürde ilk kez bu ölçekte önemli bir eksikliği kapatmıştır. Sağlıklı ve MI sonrası nörokardiyak dinamiklerin detaylarını anlamamızı sağladı. Bu tez çalışmasında sunulan bulgular, VGLUT2 ekspresyonu ile karakterize edilen önemli ve büyük bir kardiyak afferent inervasyon popülasyonunu anlamamıza katkıda bulunarak bu verinin yardımı ile daha ileri mekanik ve fonksiyonel çalışmaların temelini atılmasına yardımcı olacaktır.

Kardiyak fizyolojinin vagal ve spinal kökenli afferent kontrolünü daha iyi anlamak için akciğerlerde (71) ve gastrointestinal sistemde (75) yapılanlara benzer kardiyak spesifik vagal efferent ve afferent lifleri tanımlamayı amaçlayan gelecekteki çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 9. KAYNAKLAR

1. D’Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. C. 101, British Journal of Anaesthesia. Oxford University Press; 2008. s. 8–16, 2008.
2. Alshami AM. Pain: Is It All in the Brain or the Heart? C. 23, Current Pain and Headache Reports. Current Medicine Group LLC 1; 2019., 2019.
3. Kyloh M, Nicholas S, Zagorodnyuk VP, Brookes SJ, Spencer NJ. Identification of the visceral pain pathway activated by noxious colorectal distension in mice. *Front Neurosci.* 5:16, 2011.
4. Sharif B, Ase AR, Ribeiro-da-Silva A, Séguéla P. Differential Coding of Itch and Pain by a Subpopulation of Primary Afferent Neurons. *Neuron.* 106(6):940-951.e4, 2020.
5. Christoffels VM, Moorman AFM. Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* 2009., 2009.
6. MITCHELL GAG. The innervation of the heart. *Br Heart J.* 15(2):159–71, 1953.
7. Kawano H, Okada R, Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels.* 18(1):32–9, 2003.
8. Yamakawa K, Rajendran PS, Takamiya T, Yagishita D, So EL, Mahajan A, vd. Vagal nerve stimulation activates vagal afferent fibers that reduce cardiac efferent parasympathetic effects. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 309(9):H1579–90, 2015.
9. Han L, Limjunyawong N, Ru F, Li Z, Hall OJ, Steele H, vd. Mrgprs on vagal sensory neurons contribute to bronchoconstriction and airway hyper-responsiveness. *Nat Neurosci.* 21(3):324–8, 2018.
10. Prescott SL, Umans BD, Williams EK, Brust RD, Liberles SD. An Airway Protection Program Revealed by Sweeping Genetic Control of Vagal Afferents. *Cell.* 181(3):574-589.e14, 2020.
11. Lee LY, Yu J. Sensory nerves in lung and airways. *Compr Physiol.* 4(1):287–

324, 2014.

12. Akgul Caglar T, Gunal MY, Turhan MU, Ozturk G, Cagavi E. Experimental data of labeling the heart and cardiac cultures with a retrograde tracer in vitro and in vivo. *Data Br.* 35:106834, 2021.
13. Spencer NJ, Zagorodnyuk V, Brookes SJ, Hibberd T. Spinal afferent nerve endings in visceral organs: recent advances. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 311:1056–63, 2016.
14. Spencer NJ, Kyloh MA, Travis L, Dodds KN. Identification of spinal afferent nerve endings in the colonic mucosa and submucosa that communicate directly with the spinal cord: The gut–brain axis. *J Comp Neurol.* 528(10):1742–53, 2020.
15. Miller MR, Kasahara M. Studies on the Nerve Endings in the Heart ’.
16. Shenton FC, Campbell T, Jones JFX, Pyner S. Distribution and morphology of sensory and autonomic fibres in the subendocardial plexus of the rat heart. *J Anat.* 238(1):36–52, 2021.
17. Min S, Chang RB, Prescott SL, Beeler B, Joshi NR, Strohlic DE, vd. Arterial Baroreceptors Sense Blood Pressure through Decorated Aortic Claws. *Cell Rep.* 29(8):2192-2201.e3, 2019.
18. Song X, Gao X, Guo D, Yu Q, Guo W, He C, vd. Expression of P2X 2 and P2X 3 receptors in the rat carotid sinus, aortic arch, vena cava, and heart, as well as petrosal and nodose ganglia. *Purinergic Signal.* 8(1):15–22, 2012.
19. Liu J, Song N, Wang Y, Walker J, Yu J. A single baroreceptor unit consists of multiple sensors. *Sci Rep.* 11(1):1–11, 2021.
20. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci.* 85(1–3):1–17, 2000.
21. Spencer NJ, Kyloh MA, Travis L, Dodds KN. Sensory nerve endings arising from single spinal afferent neurons that innervate both circular muscle and myenteric ganglia in mouse colon: colon-brain axis. *Cell Tissue Res.* 381(1):25–34, 2020.
22. Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, Opthof T, Tomoyama S, Nakanishi H, vd. Quantification of sympathetic hyperinnervation and denervation after

- myocardial infarction by three-dimensional assessment of the cardiac sympathetic network in cleared transparent murine hearts. *PLoS One*. 12(7), 2017.
23. Zhou L, Neşpote V, Rowley DL, Zvara A, Santha M, Mi QS, vd. Murine peripherin gene sequences direct Cre recombinase expression to peripheral neurons in transgenic mice.
  24. Rajendran PS, Nakamura K, Ajijola OA, Vaseghi M, Armour JA, Ardell JL, vd. Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. *J Physiol*. 594(2):321–41, 2016.
  25. Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, vd. Relationship Between Regional Cardiac Hyperinnervation and Ventricular Arrhythmia [Internet]. C. 101, *Circulation*. 2000, 2000.
  26. Shenton FC, Campbell T, Jones JFX, Pyner S. Distribution and morphology of sensory and autonomic fibres in the subendocardial plexus of the rat heart. *J Anat*. 238(1):36–52, 2021.
  27. Hanna P, Dacey MJ, Brennan J, Moss A, Robbins S, Achanta S, vd. Innervation and Neuronal Control of the Mammalian Sinoatrial Node a Comprehensive Atlas. *Circ Res*. :1279–96, 2021.
  28. Rajendran PS, Challis RC, Fowlkes CC, Hanna P, Tompkins JD, Jordan MC, vd. Identification of peripheral neural circuits that regulate heart rate using optogenetic and viral vector strategies. *Nat Commun*. 10(1):1–13, 2019.
  29. Kandel E. *Kandel-principle of neuronal science*.
  30. Chen J, Liu Z, Ma L, Gao S, Fu H, Wang C, vd. Targeting Epigenetics and Non-coding RNAs in Myocardial Infarction: From Mechanisms to Therapeutics. *Front Genet*. 12:780649, 2021.
  31. Barnett MW, Larkman PM. The action potential. *Pract Neurol*. 7(3):192–7, 2007.
  32. Maday S, Twelvetrees AE, Moughamian AJ, Holzbaur ELF. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron*. 84(2):292–309, 2014.
  33. Fontaine AK, Futia GL, Rajendran PS, Littich SF, Mizoguchi N, Shivkumar K,

- vd. Optical vagus nerve modulation of heart and respiration via heart-injected retrograde AAV. *Sci Rep.* 11(1), 2021.
34. Han W, Tellez LA, Perkins MH, Perez IO, Qu T, Ferreira J, vd. A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. *Cell.* 175(3):665-678.e23, 2018.
  35. Spencer NJ, Kyloh M, Duffield M. Identification of different types of spinal afferent nerve endings that encode noxious and innocuous stimuli in the large intestine using a novel anterograde tracing technique. *PLoS One.* 9(11), 2014.
  36. [www.addgene.org](http://www.addgene.org). Addgene - Homepage. AddGene. 2015., 2015.
  37. Ludwig PE, Reddy V, Varacallo M. *Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS)*. İçinde Treasure Island (FL); 2022., 2022.
  38. Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb Clin Neurol.* 115:29–41, 2013.
  39. Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas.* 38(5):R89–118, 2017.
  40. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 9(5):286–94, 2012.
  41. Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. *Anat Rec.* 247(2):289–98, 1997.
  42. Adams D, Cuevas J. Electrophysiological properties of intrinsic cardiac neurons: The foundation of neurocardiology. İçinde: *Basic and Clinical Neurocardiology*. New York: Oxford University Press; 2004. s. 60, 2004.
  43. Kupari J, Häring M, Agirre E, Castelo-Branco G, Ernfors P. An Atlas of Vagal Sensory Neurons and Their Molecular Specialization. *Cell Rep.* 27(8):2508-2523.e4, 2019.
  44. Bourane S, Grossmann KS, Britz O, Dalet A, Del Barrio MG, Stam FJ, vd. Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell.* 160(3):503–15, 2015.
  45. Olson W, Abdus-Saboor I, Cui L, Burdge J, Raabe T, Ma M, vd. Sparse genetic tracing reveals regionally specific functional organization of mammalian nociceptors. , 2017.

46. Warwick C, Cassidy C, Hachisuka J, Wright MC, Baumbauer KM, Adelman PC, vd. MrgprdCre lineage neurons mediate optogenetic allodynia through an emergent polysynaptic circuit. *Pain*. 162(7):2120–31, 2021.
47. Olson W, Luo W. Somatotopic organization of central arbors from nociceptive afferents develops independently of their intact peripheral target innervation. *J Comp Neurol*. 526(18):3058–65, 2018.
48. Vrontou S, Wong AM, Rau KK, Koerber HR, Anderson DJ. Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. *Nature*. 493(7434):669–73, 2013.
49. Morelli C, Castaldi L, Brown SJ, Streich LL, Websdale A, Taberner FJ, vd. Identification of a novel population of peripheral sensory neuron that regulates blood pressure. *bioRxiv.*, 2020.
50. Patton KT, Thibodeau GA. *Anatomy & physiology* / Kevin T. Patton, Gary A. Thibodeau. 7th ed. *Anatomy & physiology*. St. Louis, Mo.: Mosby/Elsevier; 2010., 2010.
51. Tortora 2016. Tortora. C. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2016. 569–576 s., 2016.
52. Horsthuis T, Buermans HPJ, Brons JF, Verkerk AO, Bakker ML, Wakker V, vd. Gene Expression Profiling of the Forming Atrioventricular Node Using a Novel *Tbx3*-Based Node-Specific Transgenic Reporter. *Circ Res*. 105(1):61–9, 2009.
53. Robinson BF, Epstein SE, Beiser GD, Braunwald E. Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise. *Circ Res*. 19(2):400–11, 1966.
54. Levy MN. Autonomic interactions in cardiac control. *Ann N Y Acad Sci*. 601:209–21, 1990.
55. Ito M, Zipes DP. Efferent sympathetic and vagal innervation of the canine right ventricle. *Circulation*. 90(3):1459–68, 1994.
56. Crick SJ, Anderson RH, Ho SY, Sheppard MN. Localisation and quantitation of autonomic innervation in the porcine heart II: endocardium, myocardium and epicardium. *J Anat*. 195 ( Pt 3(Pt 3):359–73, 1999.



57. Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2(2):185–94, 2009.
58. Lazzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Long QT Syndrome: An Emerging Role for Inflammation and Immunity. *Front Cardiovasc Med.* 2:26, 2015.
59. Fedele L, Brand T. The intrinsic cardiac nervous system and its role in cardiac pacemaking and conduction. C. 7, *Journal of Cardiovascular Development and Disease.* MDPI; 2020. s. 1–33, 2020.
60. Huang WA, Boyle NG, Vaseghi M. Cardiac Innervation and the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death. C. 9, *Cardiac Electrophysiology Clinics.* W.B. Saunders; 2017. s. 665–79, 2017.
61. Dilsizian V, Narula J. Atlas of Cardiac Innervation. *Atlas of Cardiac Innervation.* 2017., 2017.
62. Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl).* 209(6):425–38, 2005.
63. Pardini BJ, Lund DD, Schmid PG. Innervation patterns of the middle cervical-stellate ganglion complex in the rat. *Neurosci Lett.* 117(3):300–6, 1990.
64. Konishi S, Otsuka M. Blockade of slow excitatory post-synaptic potential by substance P antagonists in guinea-pig sympathetic ganglia. *J Physiol.* 361:115–30, 1985.
65. Hardwick JC, Mawe GM, Parsons RL. Evidence for afferent fiber innervation of parasympathetic neurons of the guinea-pig cardiac ganglion. *J Auton Nerv Syst.* 53(2–3):166–74, 1995.
66. Cervero F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev.* 74(1):95–138, 1994.
67. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, vd. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Hear Rhythm.* 8(5):731–8, 2011.
68. Hopkins DA, Bieger D, deVente J, Steinbusch WM. Vagal efferent projections: viscerotomy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog Brain Res.* 107:79–96, 1996.

69. Ardell JL, Rajendran PS, Nier HA, KenKnight BH, Armour JA. Central-peripheral neural network interactions evoked by vagus nerve stimulation: functional consequences on control of cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309(10):H1740-52, 2015.
70. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ. Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia of rat atria: An anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 410(2):320–41, 1999.
71. Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal sensory neuron subtypes that differentially control breathing. *Cell.* 161(3):622–33, 2015.
72. Tanaka S, Abe C, Abbott SBG, Zheng S, Yamaoka Y, Lipsey JE, vd. Vagus nerve stimulation activates two distinct neuroimmune circuits converging in the spleen to protect mice from kidney injury. *Proc Natl Acad Sci.* 118(12):e2021758118, 2021.
73. Randall DC, Brown DR, McGuirt AS, Thompson GW, Armour JA, Ardell JL. Interactions within the intrinsic cardiac nervous system contribute to chronotropic regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285(5):R1066-75, 2003.
74. Palma JA, Benarroch EE. Neural control of the heart: Recent concepts and clinical correlations. *Neurology.* 83(3):261–71, 2014.
75. Williams EKK, Chang RBB, Strohlic DEE, Umans BDD, Lowell BBB, Liberles SDD. Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. *Cell.* 166(1):209–21, 2016.
76. Armour JA. Potential clinical relevance of the “little brain” on the mammalian heart. *Exp Physiol.* 93(2):165–76, 2008.
77. Dong X, Han SK, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons cord (reviewed in Snider and McMahon, 1998). In addition, C-fibers innervate a variety of peripheral targets including the skin, gut, vasculature, and muscle. *Within. C.* 106, *Cell.* 2001, 2001.
78. Quigg M. Distribution of vagal afferent fibers of the guinea pig heart labeled by

- anterograde transport of conjugated horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Syst.* 36(1):13–24, 1991.
79. Kuo DC, Oravitz JJ, DeGroat WC. Tracing of afferent and efferent pathways in the left inferior cardiac nerve of the cat using retrograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 321(1):111–8, 1984.
80. Vance WH, Bowker RC. Spinal origins of cardiac afferents from the region of the left anterior descending artery. *Brain Res.* 258(1):96–100, 1983.
81. Jänig W. The integrative action of the autonomic nervous system: Neurobiology of homeostasis. *Integr Action Auton Nerv Syst Neurobiol Homeost.* :1–610, 2006.
82. Foreman RD, Garrett KM, Blair RW. Mechanisms of cardiac pain. *Compr Physiol.* 5(2):929–60, 2015.
83. Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH. The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 18(21):8648–59, 1998.
84. Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. Molecular and Functional Analysis of a Novel Neuronal Vesicular Glutamate Transporter\*. *J Biol Chem.* 276(39):36764–9, 2001.
85. Malet M, Brumovsky PR. VGLUTs and glutamate synthesis—focus on DRG neurons and pain. *Biomolecules.* 5(4):3416–37, 2015.
86. Wink J, van Delft R, Notenboom RGE, Wouters PF, DeRuiter MC, Plevier JWM, vd. Human adult cardiac autonomic innervation: Controversies in anatomical knowledge and relevance for cardiac neuromodulation. C. 227, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* Elsevier B.V.; 2020., 2020.
87. Salavatian S, Yamaguchi N, Hoang J, Lin N, Patel S, Ardell JL, vd. Premature ventricular contractions activate vagal afferents and alter autonomic tone: implications for premature ventricular contraction-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 317(3):H607–16, 2019.
88. Hoover DB, Shepherd A V., Southerland EM, Armour JA, Ardell JL. Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from

- dog ventricular myocardium. *Auton Neurosci Basic Clin.* 141(1–2):38–45, 2008.
89. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Lowell BB. Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron.* 71(1):142–54, 2011.
  90. Li CY, Li YG. Cardiac Sympathetic Nerve Sprouting and Susceptibility to Ventricular Arrhythmias after Myocardial Infarction. C. 2015, *Cardiology Research and Practice.* Hindawi Publishing Corporation; 2015., 2015.
  91. Day SM, Coutu P, Wang W, Herron T, Turner I, Shillingford M, vd. Cardiac-directed parvalbumin transgene expression in mice shows marked heart rate dependence of delayed Ca<sup>2+</sup> buffering action. *Physiol Genomics.* 33:312–22, 2008.
  92. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, vd. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci.* 13(1):133–40, 2010.
  93. Balaram P, Takahata T, Kaas JH. VGLUT2 mRNA and protein expression in the visual thalamus and midbrain of prosimian galagos (*Otolemur garnetti*). *Eye Brain.* 2011(3):5–15, 2011.
  94. Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, vd. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature.* 462(7273):651–5, 2009.
  95. Li L, Rutlin M, Abraira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, vd. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell.* 147(7):1615–27, 2011.
  96. Lou S, Duan B, Vong L, Lowell BB, Ma Q. Runx1 controls terminal morphology and mechanosensitivity of VGLUT3-expressing C-Mechanoreceptors. *J Neurosci.* 33(3):870–82, 2013.
  97. Brumovsky P, Watanabe M, Hökfelt T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience.* 147(2):469–90, 2007.
  98. Mabe AM, Hoard JL, Duffourc MM, Hoover DB. Localization of cholinergic

- innervation and neurturin receptors in adult mouse heart and expression of the neurturin gene. *Cell Tissue Res.* 326(1):57–67, 2006.
99. Richardson RJ, Grkovic I, Allen AM, Anderson CR. Separate neurochemical classes of sympathetic postganglionic neurons project to the left ventricle of the rat heart. *Cell Tissue Res.* 324(1):9–16, 2006.
  100. Hoard JL, Hoover DB, Mabe AM, Blakely RD, Feng N, Paolucci N. Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75. *Neuroscience.* 156(1):129–42, 2008.
  101. Olshansky B. Interrelationships Between the Autonomic Nervous System and Atrial Fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis.* 48(1):57–78, 2005.
  102. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol.* 298(2):335–43, 2006.
  103. Shtukmaster S, Schier MC, Huber K, Krispin S, Kalcheim C, Unsicker K. Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo. :4–10, 2013.
  104. Case CP, Matthews MR. A quantitative study of structural features, synapses and nearest-neighbour relationships of small, granule-containing cells in the rat superior cervical sympathetic ganglion at various adult stages. *Neuroscience.* 15(1):237–82, 1985.
  105. Libet B, Owman C. Concomitant changes in formaldehyde-induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory post-synaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion, induced by stimulation of the preganglionic nerve or by a muscarinic agent. *J Physiol.* 237(3):635–62, 1974.
  106. Libet B, Tosaka T. Slow inhibitory and excitatory postsynaptic responses in single cells of mammalian sympathetic ganglia. *J Neurophysiol.* 32(1):43–50, 1969.
  107. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza AG, Inokaitis H, Masaityte A, vd. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *J Anat.* 228(1):26–46, 2016.
  108. Takaki F, Nakamuta N, Kusakabe T, Yamamoto Y. Sympathetic and sensory

- innervation of small intensely fluorescent (SIF) cells in rat superior cervical ganglion. *Cell Tissue Res.* 359(2):441–51, 2015.
109. Scalco A, Moro N, Mongillo M, Zaglia T. Neurohumoral Cardiac Regulation: Optogenetics Gets Into the Groove. *Front Physiol.* 12(August):1–23, 2021.
  110. Klein M, Csöbönyeiová M, Žiaran S, Danišovič L, Varga I. Cardiac telocytes 16 years on—What have we learned so far, and how close are we to routine application of the knowledge in cardiovascular regenerative medicine? *Int J Mol Sci.* 22(20), 2021.
  111. Kostin S. Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med.* 14(7):1917–21, 2010.
  112. Iancu CB, Rusu MC, Mogoantă L, Hostiuc S, Grigoriu M. Myocardial Telocyte-Like Cells: A Review Including New Evidence. *Cells Tissues Organs.* 206(1–2):16–25, 2019.
  113. Rusu MC, Mănoiu VS, Crețoiu D, Crețoiu SM, Vrapciu AD. Stromal cells/telocytes and endothelial progenitors in the perivascular niches of the trigeminal ganglion. *Ann Anat = Anat Anzeiger Off organ Anat Gesellschaft.* 218:141–55, 2018.
  114. Ibba-Manneschi L, Rosa I, Manetti M. Telocyte implications in human pathology: An overview. *Semin Cell Dev Biol.* 55:62–9, 2016.
  115. Petrea CE, Rusu MC, Mănoiu VS, Vrapciu AD. Telocyte-like cells containing Weibel–Palade bodies in rat lamina fusca. *Ann Anat - Anat Anzeiger.* 218:88–94, 2018.
  116. Popescu LM, Faussone-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. C. 14, *Journal of cellular and molecular medicine.* 2010. s. 729–40, 2010.
  117. Popescu LM, Gherghiceanu M, Suciuc LC, Manole CG, Hinescu ME. Telocytes and putative stem cells in the lungs: electron microscopy, electron tomography and laser scanning microscopy. *Cell Tissue Res.* 345(3):391–403, 2011.
  118. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Sáez FJ, Díaz-Flores LJ, Valladares F, vd. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and

- a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol.* 29(7):831–70, 2014.
119. Petrea CE, Crăițoiu Ș, Vrapciu AD, Mănoiu VS, Rusu MC. The telopode- and filopode-projecting heterogeneous stromal cells of the human sclera niche. *Ann Anat = Anat Anzeiger Off organ Anat Gesellschaft.* 218:129–40, 2018.
  120. Xavier S, Sahu RK, Landes SG, Yu J, Taylor RP, Ayyadevara S, vd. Pericytes and immune cells contribute to complement activation in tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 312(3):F516–32, 2017.
  121. Chen Q, Zhang H, Liu Y, Adams S, Eilken H, Stehling M, vd. Endothelial cells are progenitors of cardiac pericytes and vascular smooth muscle cells. *Nat Commun.* 7:1–13, 2016.
  122. Sandstedt J, Jonsson M, Lindahl A, Jeppsson A, Asp J. C-kit<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells found in the adult human heart represent a population of endothelial progenitor cells. *Basic Res Cardiol.* 105(4):545–56, 2010.
  123. Gherghiceanu M, Popescu LM. Cardiomyocyte precursors and telocytes in epicardial stem cell niche: Electron microscope images. *J Cell Mol Med.* 14(4):871–7, 2010.
  124. Nees S, Weiss DR, Juchem G. Focus on cardiac pericytes. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 465(6):779–87, 2013.
  125. Chen WCW, Baily JE, Corselli M, Díaz ME, Sun B, Xiang G, vd. Human myocardial pericytes: Multipotent mesodermal precursors exhibiting cardiac specificity. *Stem Cells.* 33(2):557–73, 2015.
  126. Beltrami AP, Madeddu P. Pericytes and cardiac stem cells: Common features and peculiarities. *Pharmacol Res.* 127:101–9, 2018.
  127. Gurbani S, Chayasirisobhon S, Cahan L, Choi S, Enos B, Hwang J, vd. Neuromodulation Therapy with Vagus Nerve Stimulation for Intractable Epilepsy: A 2-Year Efficacy Analysis Study in Patients under 12 Years of Age. *Epilepsy Res Treat.* 2016:1–5, 2016.
  128. Nahas Z, Marangell LB, Husain MM, Rush AJ, Sackeim HA, Lisanby SH, vd. Two-year outcome of vagus nerve stimulation (VNS) for treatment of major depressive episodes. *J Clin Psychiatry.* 66(9):1097–104, 2005.

129. Bonaz B, Sinniger V, Hoffmann D, Clarençon D, Mathieu N, Dantzer C, vd. Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease: a 6-month follow-up pilot study. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc.* 28(6):948–53, 2016.
130. Salavatian S, Beaumont E, Longpré JP, Armour JA, Vinet A, Jacquemet V, vd. Vagal stimulation targets select populations of intrinsic cardiac neurons to control neurally induced atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 311(5):H1311–20, 2016.
131. Hanna P, Rajendran PS, Ajjola OA, Vaseghi M, Andrew Armour J, Ardell JL, vd. Cardiac neuroanatomy - Imaging nerves to define functional control. C. 207, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* Elsevier B.V.; 2017. s. 48–58, 2017.
132. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.*, 2005.
133. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci.* 18(9):1213–25, 2015.
134. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, vd. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(24):13940–5, 2003.
135. Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods.*, 2006.
136. Pastrana E. Optogenetics: controlling cell function with light. *Nat Methods.* 8(1):24–5, 2011.
137. Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol.* 15(24):2279–84, 2005.
138. Li X, Gutierrez D V, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, vd. Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci.* 102(49):17816–21, 2005.



139. O'Shea C, Holmes AP, Winter J, Correia J, Ou X, Dong R, vd. Cardiac Optogenetics and Optical Mapping – Overcoming Spectral Congestion in All-Optical Cardiac Electrophysiology. *Front Physiol.* 10, 2019.
140. Menuet C, Connelly AA, Bassi JK, Melo MR, Le S, Kamar J, vd. Prebötzing complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. *Elife.* 9:1–30, 2020.
141. Machhada A, Hosford PS, Dyson A, Ackland GL, Mastitskaya S, Gourine A V. Optogenetic Stimulation of Vagal Efferent Activity Preserves Left Ventricular Function in Experimental Heart Failure. *JACC Basic to Transl Sci.* 5(8):799–810, 2020.
142. Moreno A, Endicott K, Skancke M, Dwyer MK, Brennan J, Efimov IR, vd. Sudden Heart Rate Reduction Upon Optogenetic Release of Acetylcholine From Cardiac Parasympathetic Neurons in Perfused Hearts. *Front Physiol.* 10, 2019.
143. Wang HJ, Wang W, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension.* 64(4):745–55, 2014.
144. Shen MJ, Zipes DP. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ Res.* 114(6):1004–21, 2014.
145. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac Innervation and Sudden Cardiac Death. *Circ Res.* 116(12):2005–19, 2015.
146. Chen PS, Chen LS, Cao JM, Sharifi B, Karagueuzian HS, Fishbein MC. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death. *Cardiovasc Res.* 50(2):409–16, 2001.
147. Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, vd. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation.* 101(16):1960–9, 2000.
148. Vracko R, Thorning D, Frederickson RG. Nerve Fibers in Human Myocardial Scars.
149. Yoshie K, Rajendran PS, Massoud L, Mistry J, Swid MA, Wu X, vd. Cardiac

- TRPV1 afferent signaling promotes arrhythmogenic ventricular remodeling after myocardial infarction. *JCI Insight*. 5(3), 2020.
150. Zhu C, Rajendran P, Hanna P, Emov I, Washington G, Salama G, vd. Altered Sympathetic Control of Myocardial Infarct Border Zones: High-Resolution Mapping with Automated Structure Detection.
  151. McIntosh HD. The stabilizing and unstabilizing influences of neurogenic and vascular activities of the heart as related to sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*. 5(6, Supplement 1):105B-110B, 1985.
  152. Reichert K, Colantuono B, McCormack I, Rodrigues F, Pavlov V, Abid MR. Murine Left Anterior Descending (LAD) Coronary Artery Ligation: An Improved and Simplified Model for Myocardial Infarction. *J Vis Exp*. (122), 2017.
  153. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, vd. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 26(3):638–45, 2008.
  154. Ueda HR, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, vd. Tissue clearing and its applications in neuroscience. C. 21, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Research; 2020. s. 61–79, 2020.
  155. Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, vd. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*. 4(4):331–6, 2007.
  156. Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, vd. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*. 7(11):1983–95, 2012.
  157. Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Loubopoulos A, Matryba P, vd. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods*. 13(10):859–67, 2016.
  158. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 159(4):896–910, 2014.

159. Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, vd. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 497(7449):332–7, 2013.
160. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, vd. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*. 14(11):1481–8, 2011.
161. Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*. 16(8):1154–61, 2013.
162. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, vd. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*. 157(3):726–39, 2014.
163. Tuchin V V. Optical clearing of tissues and blood using the immersion method. *J Phys D Appl Phys*. 38(15):2497–518, 2005.
164. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, vd. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep*. 24(8):2196-2210.e9, 2018.
165. Murakami TC, Mano T, Saikawa S, Horiguchi SA, Shigeta D, Baba K, vd. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat Neurosci*. 21(4):625–37, 2018.
166. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*. 34(4):147–59, 2018.
167. Branda CS, Dymecki SM. Talking about a Revolution: The Impact of Site-Specific Recombinases on Genetic Analyses in Mice. *Dev Cell*. 6(1):7–28, 2004.
168. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*. 7(1):1–12, 2017.
169. Çağlar TA. Sinir Hücreleri İle Kalp Kası Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Moleküler Ve Elektrofizyolojik Düzeyde Araştırılması. 2021.

170. Neckel PH, Mattheus U, Hirt B, Just L, Mack AF. Large-scale tissue clearing (PACT): Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure. *Sci Rep.* 6, 2016.
171. Chowdhury M, Alzoubi K, Khandakar A, Khallifa R, Abouhasera R, Koubaa S, vd. Wearable Real-Time Heart Attack Detection and Warning System to Reduce Road Accidents. *Sensors.* 19:2780, 2019.
172. Challis RC, Kumar SR, Chan KY, Challis C, Jang MJ, Rajendran PS, vd. Widespread and targeted gene expression by systemic AAV vectors: Production, purification, and administration. *Nat Protoc.* :246405, 2018.
173. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY).* 40(5):155–60, 2011.
174. Government US. The Heart's Pacemaker Mimics Brain Cytoarchitecture and Function: Autonomic innervation, a peripheral glial cell web, and a novel S100B expressing interstitial cell type impart structural and functional complexity to the sinoatrial node. , 2022.
175. Irie T, Yamakawa K, Hamon D, Nakamura K, Shivkumar K, Vaseghi M. Cardiac sympathetic innervation via middle cervical and stellate ganglia and antiarrhythmic mechanism of bilateral stellectomy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 312(3):H392–405, 2017.
176. Ganesh A, Qadri YJ, Boortz-Marx RL, Al-Khatib SM, Harpole DH, Katz JN, vd. Stellate Ganglion Blockade: an Intervention for the Management of Ventricular Arrhythmias. *Curr Hypertens Rep.* 22(12), 2020.
177. Jankowska EA, Ponikowski P, Piepoli MF, Banasiak W, Anker SD, Poole-Wilson PA. Autonomic imbalance and immune activation in chronic heart failure – Pathophysiological links. *Cardiovasc Res.* 70(3):434–45, 2006.
178. Cavallari I, Cannon CP, Braunwald E, Goodrich EL, Im K, Lukas MA, vd. Metabolic syndrome and the risk of adverse cardiovascular events after an acute coronary syndrome. C. 25, *European journal of preventive cardiology.* England; 2018. s. 830–8, 2018.
179. Wang D, Wu Y, Chen Y, Wang A, Lv K, Kong X, vd. Focal selective chemo-ablation of spinal cardiac afferent nerve by resiniferatoxin protects the heart

- from pressure overload-induced hypertrophy. *Biomed Pharmacother.* 109(August 2018):377–85, 2019.
180. Wake E, Brack K. Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. *C. 199, Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* Elsevier B.V.; 2016. s. 3–16, 2016.
  181. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ. A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: Chemoreceptors as well as baroreceptors. *J Auton Nerv Syst.* 67(1–2):1–14, 1997.
  182. Zaglia T, Mongillo M. Cardiac sympathetic innervation, from a different point of (re)view. *C. 595, Journal of Physiology.* Blackwell Publishing Ltd; 2017. s. 3919–30, 2017.
  183. Zhang Y, Ye F, Zhang T, Lv S, Zhou L, Du D, vd. Structural basis of ketamine action on human NMDA receptors. *Nature.* 596(7871):301–5, 2021.
  184. Ragauskas T, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauziene N, Inokaitis H, Pauza DH. Chemical phenotypes of intrinsic cardiac neurons in the newborn pig (*Sus scrofa domesticus* Erxleben, 1777). *J Morphol.* 283(1):51–65, 2022.
  185. Standish A, Enquist LW, Escardo JA, Schwaber JS. Central neuronal circuit innervating the rat heart defined by transneuronal transport of pseudorabies virus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 15(3 Pt 1):1998–2012, 1995.
  186. Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res.* 491(1):156–62, 1989.
  187. Chang RB. Optogenetic control of the peripheral nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 9(12):1–20, 2019.
  188. Jarvinen MK, Powley TL. Dorsal motor nucleus of the vagus neurons: a multivariate taxonomy. *J Comp Neurol.* 403(3):359–77, 1999.
  189. Du H, Hou P, Wang L, Wang Z, Li Q. Modified CLARITY Achieving Faster and Better Intact Mouse Brain Clearing and Immunostaining. *Sci Rep.* 9(1), 2019.
  190. Nehrhoff I, Bocancea D, Vaquero J, Vaquero JJ, Ripoll J, Desco M, vd. 3D imaging in CUBIC-cleared mouse heart tissue: going deeper. *Biomed Opt*

- Express. 7(9):3716, 2016.
191. Wang Z, Zhang J, Fan G, Zhao H, Wang X, Zhang J, vd. Imaging transparent intact cardiac tissue with single-cell resolution. *Biomed Opt Express*. 9(2):423, 2018.
  192. White IA, Gordon J, Balkan W, Hare JM. Sympathetic reinnervation is required for mammalian cardiac regeneration. *Circ Res*. 117(12):990–4, 2015.
  193. Liu J, Song N, Wang Y, Walker J, Yu J. A single baroreceptor unit consists of multiple sensors. *Sci Rep*. 11(1), 2021.
  194. Spencer NJ, Kyloh M, Duffield M. Identification of different types of spinal afferent nerve endings that encode noxious and innocuous stimuli in the large intestine using a novel anterograde tracing technique. *PLoS One*. 9(11), 2014.
  195. Gebhart GF. Visceral pain-peripheral sensitisation. *Gut*. 47 Suppl 4(Suppl 4):iv54-5; discussion iv58, 2000.
  196. Axonal EOF, On I, Cheah TB, Geffen LB. TYROSINE HYDROXYLASE AND MONOAMINE OXIDASE LEVELS I N SYMPATHETIC GANGLIA A combined morphological and biochemical study was made of the responses of lumbar sympathetic ganglion cells to ligation of their axons in the sciatic nerve of the rat . There was . 4(5):443–52, 1973.
  197. Spencer NJ, Sorensen J, Travis L, Wiklendt L, Costa M, Hibberd T. Imaging activation of peptidergic spinal afferent varicosities within visceral organs using novel CGRP-mCherry reporter mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 311:880–94, 2016.
  198. Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F, Ieda Y, Taniguchi M, vd. Sema3a maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nat Med*. 13(5):604–12, 2007.
  199. Mühlfeld C, Papadakis T, Krasteva G, Nyengaard JR, Hahn U, Kummer W. An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *J Appl Physiol*. 108(5):1402–9, 2010.
  200. Pauza DH, Saburkina I, Rysevaite K, Inokaitis H, Jokubauskas M, Jalife J, vd. Neuroanatomy of the murine cardiac conduction system. A combined

- stereomicroscopic and fluorescence immunohistochemical study. *Auton Neurosci Basic Clin.* 176(1–2):32–47, 2013.
201. Saburkina I, Gukauskiene L, Rysevaite K, Brack KE, Pauza AG, Pauziene N, vd. Morphological pattern of intrinsic nerve plexus distributed on the rabbit heart and interatrial septum. *J Anat.* 224(5):583–93, 2014.
  202. Inokaitis H, Pauziene N, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza DH. Innervation of sinoatrial nodal cells in the rabbit. *Ann Anat.* 205:113–21, 2016.
  203. Pauziene N, Rysevaite-Kyguoliene K, Alaburda P, Pauza AG, Skukauskaite M, Masaityte A, vd. Neuroanatomy of the Pig Cardiac Ventricles. A Stereomicroscopic, Confocal and Electron Microscope Study. *Anat Rec.* 300(10):1756–80, 2017.
  204. Pauza DH, Skripka V, Pauziene N. Morphology of the intrinsic cardiac nervous system in the dog: A whole-mount study employing histochemical staining with acetylcholinesterase. *Cells Tissues Organs.* 172(4):297–320, 2002.
  205. Saburkina I, Pauza DH. Location and variability of epicardiac ganglia in human fetuses. *Anat Embryol (Berl).* 211:585–94, 2006.
  206. Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. *Anat Rec.* 259(4):353–82, 2000.
  207. Liu Y, Yang FC, Okuda T, Dong X, Zylka MJ, Chen CL, vd. Mechanisms of compartmentalized expression of Mrg class G-protein-coupled sensory receptors. *J Neurosci.* 28(1):125–32, 2008.
  208. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, vd. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.*, 2015.
  209. Wittenberger T, Schaller HC, Hellebrand S. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol.* 307(3):799–813, 2001.
  210. Ross PC, Figler RA, Corjay MH, Barber CM, Adam N, Marcus DR, vd. RTA, a candidate G protein-coupled receptor: Cloning, sequencing, and tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(8):3052–6, 1990.

211. Zhou C, Li J, Liu L, Tang Z, Wan F, Lan L. Expression and localization of MrgprD in mouse intestinal tract. *Cell Tissue Res.* 377(2):259–68, 2019.
212. Dwyer DF, Barrett NA, Austen KF, Kim EY, Brenner MB, Shaw L, vd. Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. *Nat Immunol.* 17(7):878–87, 2016.
213. Vongvatcharanon U, Vongvatcharanon S. Localization of Parvalbumin Calcium Binding Protein in the Rat Heart. *C. 29, ScienceAsia.* 2003, 2003.
214. Barber MJ, Mueller TM, Henry DP, Felten SY, Zipes DP. Transmural myocardial infarction in the dog produces sympathectomy in noninfarcted myocardium. *Circulation.* 67(4):787–96, 1983.
215. Nori SL, Gaudino M, Alessandrini F, Bronzetti E, Santarelli P. Immunohistochemical evidence for sympathetic denervation and reinnervation after necrotic injury in rat myocardium. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 41(6):799–807, 1995.
216. Ardell JL, Cardinal R, Vermeulen M, Armour JA. Dorsal spinal cord stimulation obtunds the capacity of intrathoracic extracardiac neurons to transduce myocardial ischemia. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 297(2):R470–7, 2009.
217. Salavatian S, Yamaguchi N, Hoang J, Lin N, Patel S, Ardell JL, vd. Premature ventricular contractions activate vagal afferents and alter autonomic tone: implications for premature ventricular contraction-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 317:607–16, 2019.
218. Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, vd. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science.* 327(5973):1653–7, 2010.
219. Schobesberger S, Wright P, Tokar S, Bhargava A, Mansfield C, Glukhov A V, vd. T-tubule remodelling disturbs localized  $\beta$ 2-adrenergic signalling in rat ventricular myocytes during the progression of heart failure. *Cardiovasc Res.* 113(7):770–82, 2017.



## 10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-38828770-772.02-1537  
Konu: Etik Kurulu Kararı

04/03/2022

**Sayın Ar. Gör. SEVİLAY ŞAHOĞLU GÖKTAŞ**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 13.03.2019 tarihli 38828770-604.01.01-E.10845 sayı no ile onay verilen "Kalbe Özgü Arka Kök Gangliyon Duyu Nöronlarının Moleküler ve İşlevsel İncelenmesi" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda verilen araştırma açık adı yerine "Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Transgenik Yaklaşım Kullanılarak Sağlıklı ve İskemik Hasar Sonrası Fare Kalbinde İncelenmesi" olarak değiştirilmesi isteği.

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 36BC4B24X7 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)  
Kavacık Mah. Ekinçiler Cad. No: 19, Kavacık Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul  
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55  
E-Posta: [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr) İnternet Adresi: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA

Tel: [REDACTED]



04.03.2022

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI'NA,**

“Kalbe özgü arka kök gangliyon duyu nöronlarının moleküler ve işlevsel incelenmesi” isimli sinirbilim doktora tezime ait 13.03.2019 tarihli 38828770-604.01.01-E.10845 sayılı etik kurul kararınız için öncelikle teşekkür ederiz. Doktora tez başlığımın “Kalbe özgü duyu nöronlarının transgenik yaklaşım kullanılarak sağlıklı ve iskemik hasar sonrası fare kalbinde incelenmesi” şeklinde değiştirilmesi hususunu değerlendirme ve bilgilerinize sunarım.

Saygılarımla,

Ar. Gör. Sevilay Şahoğlu Göktaş

İstanbul Medipol Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AbD  
Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)  
Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Beykoz 34810 İstanbul  
Tel: [REDACTED]  
Email : [REDACTED]



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.10845  
Konu : Etik Kurulu Kararı

13/03/2019

**Sayın Sevilay Şahoğlu Göktaş**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Kalbe özgü arka kök gangliyon duyu nöronlarının moleküler ve işlevsel incelenmesi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 13.03.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 8FD03B7CXF kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacak Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/03/2019	06		Sevilay Şahoğlu Gökteş

"Kalbe özgü arka kök gangliyon duyu nöronlarının moleküler ve işlevsel incelenmesi" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 36 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	